

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Estudo comparativo do teor de metais
contaminantes em amostras de chás
provenientes de agricultura tradicional e
biológica**

Ana Rita Barroso Parreira

Dissertação

Mestrado em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

2012

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Estudo comparativo do teor de metais
contaminantes em amostras de chás
provenientes de agricultura tradicional e
biológica**

Ana Rita Barroso Parreira

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria Eduarda
Mendes e Professora Doutora Maria Luísa Andrade Mateus

Mestrado em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

2012

AGRADECIMENTOS

Ao longo de todo tempo do estudo e recolha de dados a ajuda científica, prática e teórica, sempre benéfica por parte das Professoras Doutoras Eduarda Mendes e Luísa Mateus, como Orientadora e Co-orientadora respectivamente, foi determinante para a realização do trabalho.

O apoio emocional e financeiro que tive dos meus pais António e Ana Paula Parreira foi essencial. À minha irmã Raquel, primas Vera Ferrão e Maria João Santos tenho de agradecer a paciência e ajuda que sempre me ofereceram. Ao António Duarte Silva agradeço a compreensão, apoio e paciência por todos os momentos de desespero, alegria e trabalho.

À Dorothea Krusch, Carolina Piçarra e Joana Noites pela disponibilidade e hospitalidade das suas casas, o apoio incondicional mostrado e amizade, muito obrigada.

À colega e amiga incondicional Catarina Fernandes que caminhou ao meu lado, passando pelas mesmas dificuldades e sucessos, o meu maior obrigado. Por tudo o que passámos juntas, pela ajuda mútua, ficará para sempre a amizade.

Às colegas de laboratório, com quem dividi espaço, material e experiências, com quem discuti e tive ajuda sempre que precisei, Ana Maria Sousa, Ana Granada, Telma Reis, Catarina Jacinto e Angela Paterna.

À Tânia Salsa e Diana Inglês, obrigada por todos os conselhos, desabafos e paciência.

RESUMO

O chá, bebida obtida através do cultivo da planta *Camellia sinensis*, sendo a mais consumida a nível global, depois da água. Uma vez que a planta surge na Natureza, esta absorve metais provenientes da água, do solo e do ambiente, no seu crescimento. Este estudo apresenta a ocorrência de metais (Alumínio, Cádmio, Chumbo, Cobre, Crómio, Arsénio e Selénio) em diferentes tipos de chá comercializados em Portugal, quinze amostras de produção tradicional e oito de produção biológica.

O estudo da prevalência de metais em alimentos tem sido realizado com muito ênfase, devido à sua importância nutricional e toxicológica.

A preparação de amostras realizou-se utilizando temperaturas elevadas (450°C) em mufla durante oito horas seguidas pela digestão ácida com ácido nítrico e peróxido de hidrogénio. As amostras foram analisadas por Espectrometria de Absorção Atómica com Câmara de Grafite e de Geração de Hidretos. O método de análise foi devidamente validado, para todos os metais determinados analiticamente, tendo em conta critérios de linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exactidão. Os resultados obtidos para a concentração de metais estão abaixo dos valores estabelecidos pela FDA.

A comparação estatística entre as diferentes variedades de chá permitiu concluir que de forma geral não existem grandes variações nas concentrações dos diferentes metais.

ABSTRACT

Tea, a leaf extract of the plant *Camellia sinensis*, is one of the most popular beverages all over the world. Since the herbs come from nature, they may absorb metals from the water or soil and sometimes from the polluted biosphere during growth. This study presents a picture of occurrence of trace metals (Aluminum, Cadmium, Lead, Copper, Chromium, Arsenic and Selenium) in different types of tea marketed in Portugal, fifteen brands from traditional agriculture and eight from biological agriculture.

After appropriate sample preparation (450°C in the muffle furnace for 8 hours followed by acid digestion with nitric acid and hydrogen peroxide), samples were analyzed by Atomic Absorption Spectrometry with a graphite furnace or hydrides generation. The methods were validated in terms of linearity, detection and qualification limits, precision and accuracy. The values obtained for the metals are below the values established by FDA.

Analysis of variance showed no statistical differences between all elements determined in tea from traditional and biological agriculture.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

A

ANOVA – teste estatístico de análise de variâncias

D

DS² – Diferença de variâncias

E

AAS – *Atomic Absorption Spectrometry* (Espectrometria de absorção atômica)

EC – Epicatequina

ECG – Galato de epicatequina

EEC – Espectrometria por emissão com chama

EGC – Epigallocatequina

EGCG – Galato de epigallocatequina

EPA – *Environmental Protection Agency*

Er – Erro relativo

F

FDA – Food and Drug Administration

G

GC – Galocatequina

GCG – Galato de galocatequina

GFAAS – *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry* (Espectrometria de absorção atômica com câmara de grafite)

H

HDL – lipoproteínas de alta densidade associadas a colesterol

HGAAS – *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry* (Espectrometria de absorção com geração de hidretos)

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

I

ICP-AES – Espectrometria de emissão com plasma de árgon indutivamente acoplado

ICP-MS – Método hifenado de fotometria de emissão com plasma de árgon com espectrometria de massa

IDA – Ingestão diária aceitável

IMC – Índice de massa corporal

L

LD – Limite de detecção

edl – Lâmpadas de descarga sem eléctrodos

LQ – Limite de quantificação

M

MRC – Materiais de Referência Certificados

P

ρ – Coeficiente de correlação

PCR – Proteína C reactiva

R

r – Limite de repetibilidade

R^2 – Coeficiente de quantificação

RSD – Desvio padrão residual

S

Se⁰ – Selénio elementar

Se²⁻ – Seleneto

Se⁴⁺ – Selenito

Se⁶⁺ – Seleniato

T

TCM – *Traditional Chinese Medicine*

W

WHO – World Health Organization

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Lista de Abreviaturas e Siglas	iv
Índice Geral	vii
Índice de Figuras e Gráficos	x
Índice de Tabelas	xii
Objectivos	xviii
Capítulo I - Introdução Teórica	1
1. Chá	1
1.1. História, produção e comercialização	1
1.2. Propriedades físicas, químicas e fisiológicas	5
2. Metais	9
2.1. Considerações gerais	9
2.2. Alumínio	10
2.3. Cádmio	12
2.4. Chumbo	13
2.5. Cobre	13
2.6. Crómio	15
2.7. Arsénio	15
2.8. Selénio	16
3. Métodos analíticos	18
3.1. Preparação de amostra	18
3.2. Espectrometria de Absorção Atómica	20
3.2.1. Espectrometria de Absorção Atómica com Câmara de Grafite	24
3.2.1.1. Interferências	26
3.2.1.1.1. Interferências físicas	27

3.2.1.1.2. Interferências químicas	27
3.2.1.2. Vantagens e desvantagens	28
3.2.2. Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos	29
3.2.2.1 Reacções de redução e processo de atomização	29
3.2.2.2. Instrumentação	30
3.2.2.3. Interferências	31
3.2.2.3.1. Interferências químicas	31
3.2.2.3.2. Interferências cinéticas	31
3.2.2.3.3. Interferências espectrais	32
3.2.2.4. Vantagens e Desvantagens	32
Capítulo II - Procedimento Experimental	33
1. Material e Reagentes	33
1.1. Amostras	33
1.2. Reagentes	34
1.3. Material e instrumentação	35
2. Preparação de amostras	37
2.1. Métodos de digestão testados	37
2.2. Método de digestão utilizado	40
3. Validação de Métodos	41
3.1. Validação indirecta	42
3.1.1 Especificidade/Selectividade	42
3.1.2. Linearidade das curvas de calibração	42
3.1.3. Limiares analíticos	43
3.1.3.1. Limite de detecção	43
3.1.3.2. Limite de quantificação	45
3.1.4. Gama de trabalho	46
3.1.5. Precisão	47
3.1.5.1. Repetibilidade	47

3.1.5.2. Precisão intermédia	47
3.3. Validação directa - Exactidão	48
4. Procedimento de análise de metais	51
4.1. Análise quantitativa de metais por GFAAS	51
4.2. Análise quantitativa de metais por HGAAS	53
Capítulo III - Resultados e Discussão	54
1. Validação de métodos	54
1.1. Validação dos métodos analisados por GFAAS	54
1.1.1. Alumínio	54
1.1.2. Cádmio	57
1.1.3. Chumbo	61
1.1.4. Cobre	65
1.1.5. Crómio	68
1.2. Validação dos métodos analisados por HGAAS	72
1.2.1. Arsénio	72
1.2.2. Selénio	75
1.3. Validação do método de digestão	78
2. Quantificação de metais na amostra	79
Capítulo IV - Conclusão	84
Bibliografia	86
Anexos	91
Anexo I – Material de Referência Certificado	91
Anexo II – Distribuição de F de Snedcor I	93
Anexo III – Distribuição de F de Snedcor II	94
Anexo IV – Gráficos Representativos da Análise Quantitativa de Metais em cada Amostra de Chá	95
Anexo V – Tabelas de Resultados do Teste ANOVA	101

ÍNDICE DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 – Esquema do processo de extracção do chá.	3
Figura 2 – Estrutura química da EGCG.	4
Figura 3 – Esquema do sistema óptico utilizado.	23
Figura 4 – Espectrómetro de absorção atómica com câmara de grafite.	24
Figura 5 – Atomizador usado em GFAAS.	25
Figura 6 – Bloco de reacção FIAS 100.	30
Gráfico 1 – Curva de calibração do alumínio.	54
Gráfico 2 – Curva de calibração do cádmio.	57
Gráfico 3 – Curva de calibração do chumbo.	61
Gráfico 4 – Curva de calibração do cobre.	65
Gráfico 5 – Curva de calibração do crómio.	68
Gráfico 6 – Curva de calibração do arsénio.	72
Gráfico 7 – Curva de calibração do selénio.	75

Gráfico 8 – Resultados obtidos para as amostras de chá produzido
tradicionalmente. 82

Gráfico 9 – Resultados obtidos para as amostras de chá de produção
biológica. 83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação de parâmetros técnicos de diferentes métodos utilizados para determinação de espécies metálicas.	22
Tabela 2 – Dados sobre as amostras analisadas.	33
Tabela 3 – Lista de reagentes utilizados.	34
Tabela 4 – Equipamentos utilizados.	35
Tabela 5 – Programa para a determinação do alumínio.	51
Tabela 6 – Programa para a determinação do cádmio.	51
Tabela 7 – Programa para a determinação do chumbo.	52
Tabela 8 – Programa para a determinação do cobre.	52
Tabela 9 – Programa para a determinação do crómio.	52
Tabela 10 – Equações das curvas de calibração linear e não linear e respectivos dados estatísticos para a avaliação da linearidade do método utilizado para o alumínio.	55
Tabela 11 – Resultados das repetições (n=10) dos padrões de 15 µg/L e de 100 µg/L, para o alumínio.	55
Tabela 12 – Resultados das repetições (n=10) de brancos, para o alumínio.	56

Tabela 13 – Valor do desvio padrão (%) para o alumínio, referente ao estudo de precisão intermédia (n=30).	56
Tabela 14 – Valores do desvio padrão residual (%), para o alumínio, referentes ao estudo de repetibilidade.	56
Tabela 15 – Equações das curvas de calibração linear e não linear e respectivos dados estatísticos para a avaliação da linearidade do método utilizado para o cádmio.	58
Tabela 16 – Resultados das repetições (n=10) dos padrões de 2 µg/L e de 10 µg/L, para o cádmio.	58
Tabela 17 – Resultados obtidos das repetições (n=10) de brancos, para o cádmio.	59
Tabela 18 – Valor de desvio padrão residual (%), para o cádmio, referente ao estudo de precisão intermédia (n=30).	59
Tabela 19 – Valores de desvio padrão residual (%), para o cádmio, referentes ao estudo de repetibilidade.	59
Tabela 20 – Teste de recuperação (%) de adição padrão em todas as amostras para o cádmio (os resultados são referentes ao valor médio n=3).	60
Tabela 21 – Equações das curvas de calibração linear e não linear e respectivos dados estatísticos para a avaliação da linearidade do método utilizado para o chumbo.	61
Tabela 22 – Resultados das repetições (n=10) dos padrões de 5 µg/L e de 25 µg/L de chumbo.	62

Tabela 23 – Resultados obtidos da leitura de brancos (n=10), para o chumbo.	62
Tabela 24 – Valor de desvio padrão residual (%), referente ao estudo de precisão intermédia do chumbo (n=30).	63
Tabela 25 – Valores de desvio padrão residual (%) referentes ao estudo de repetibilidade do chumbo.	63
Tabela 26 – Teste de recuperação (%) de adição padrão em todas as amostras para o chumbo (os resultados são referentes ao valor médio (n=3)).	64
Tabela 27 – Equações das curvas de calibração linear e não linear e respectivos dados estatísticos para a avaliação da linearidade do método utilizado para o cobre.	65
Tabela 28 – Resultados das repetições (n=10) dos padrões de 10 µg/L e de 50 µg/L de cobre.	66
Tabela 29 – Resultados obtidos da leitura de brancos (n=10), para o cobre.	66
Tabela 30 – Valor de desvio padrão residual (%), referente ao estudo de precisão intermédia do cobre (n=30).	67
Tabela 31 – Valores de desvio padrão residual (%) referentes ao estudo de repetibilidade do cobre.	67

Tabela 32 – Equações das curvas de calibração linear e não linear e respectivos dados estatísticos para a avaliação da linearidade do método utilizado para o cromo.	68
Tabela 33 – Resultados da leitura (n=10) dos padrões de 5 µg/L e de 25 µg/L de cromo.	69
Tabela 34 – Resultados obtidos da leitura (n=10) de brancos, para o cromo	70
Tabela 35 – Valor de desvio padrão residual (%) referente ao estudo de precisão intermédia, do cromo (n=30).	70
Tabela 36 – Valores de desvio padrão residual (%) referentes ao estudo de repetibilidade, para o cromo	70
Tabela 37 – Teste de recuperação (%) de adição padrão em todas as amostras para o cromo (os resultados são referentes ao valor médio n=3).	71
Tabela 38 – Equações das curvas de calibração linear e não linear e respectivos dados estatísticos para a avaliação da linearidade do método utilizado para o arsénio.	73
Tabela 39 – Resultados da leitura (n=10) do padrão de 5 µg/L e de 25 µg/L de arsénio.	73
Tabela 40 – Resultados obtidos da leitura (n=10) de brancos, para o arsénio.	74

Tabela 41 – Valor de desvio padrão residual (%) referente ao estudo de precisão intermédia, do arsénio (n=30).	74
Tabela 42 – Valores de desvio padrão residual (%) referentes ao estudo de repetibilidade, para o arsénio.	74
Tabela 43 – Equações das curvas de calibração linear e não linear e respectivos dados estatísticos para a avaliação da linearidade do método utilizado para o selénio.	76
Tabela 44 – Resultados da leitura (n=10) dos padrões de 5 µg/L e de 25 µg/L de selénio.	76
Tabela 45 – Resultados obtidos da leitura (n=10) de brancos, para o selénio.	77
Tabela 46 – Valor de desvio padrão residual (%) referente ao estudo de precisão intermédia, do selénio (n=30).	77
Tabela 47 – Valores de desvio padrão residual (%) referentes ao estudo de repetibilidade, para o selénio.	77
Tabela 48 – Teste de recuperação (%) de adição padrão em três amostras (os resultados são referentes ao valor médio n=3).	78
Tabela 49 – Análise quantitativa de metais em amostras (n=3) de chá de produção tradicional.	79
Tabela 50 – Análise quantitativa de metais em amostras (n=3) de chá de produção biológica.	80

Tabela 51 – Resultados do teste ANOVA aplicado nos grupos de
amostra de produção tradicional e de produção biológica. 81

OBJECTIVOS

O consumo de chá tem vindo a aumentar em Portugal, aumento explicado pelo facto de lhe terem sido associados muitos benefícios para a saúde. O chá é rico em muito elementos inorgânicos. Conjuntamente com muitos elementos essenciais necessários para a saúde, também podem estar presentes nas folhas do chá, alguns elementos tóxicos. Esta combinação pode dever-se à poluição do solo, à aplicação de pesticidas, fertilizantes e/ou a actividades industriais.

Apesar de haver pouca informação referente à contaminação das folhas de chá por metais é relevante saber o seu conteúdo devido ao significativo consumo que esta bebida apresenta tanto em Portugal como mundialmente. De entre os vários metais que podem estar presentes os que merecem maior atenção são os metais pesados, nomeadamente o chumbo, cádmio e arsénio, por serem especialmente tóxicos e agressivos para o homem mesmo em baixas concentrações. Para além da sua toxicidade inerente, têm a tendência para se acumularem ao longo da cadeia alimentar, devido à baixa eliminação por excreção. Também a determinação de outros elementos, como o alumínio, crómio, cobre e selénio, uma vez que o uso contínuo de chá na dieta diária pode contribuir para acumulação destes metais no organismo.

Atendendo às causas da contaminação das folhas de chá por metais, faz todo o sentido o estudo comparativo do teor dos mesmos em amostras obtidas através de produção tradicional e produção biológica. Por outro lado devido ao diferente processamento que os diversos tipos de chá atravessam pretendeu-se verificar se haveria diferenças significativas no teor de metais entre os diversos tipos de chás.

Tendo em atenção o que foi dito, os objectivos principais deste estudo são:

1 – Seleccionar e optimizar o método analítico que melhor se adequa à amostra a analisar;

2 - Analisar quantitativamente sete metais, cinco deles determinados por espectrometria de absorção atômica com câmara de grafite e dois através de espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos;

3 – Verificar qual dos tipos de produção provoca uma maior contaminação de metais no chá, através da comparação estatística dos dois grupos;

4 - Comparar as concentrações de metais para os diferentes tipos de chá da planta *Camellia sinensis* (chá preto, verde e branco) e de outras plantas.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO TEÓRICA

1. CHÁ

1.1. História, produção e comercialização

A nível mundial, o chá obtido de plantas jovens de *Camellia sinensis* é a bebida mais consumida, depois da água. O seu reconhecido valor deriva das suas características de sabor, cheiro, benefícios para a saúde e ainda às suas fortes associações culturais. Geralmente é consumido sob a forma de chá preto, *Oolong* ou verde, que são preparações originárias da planta *Camellia sinensis*, plantada abundante na China e no sudeste asiático. O chá teve origem no sudoeste da China, há 4000 anos atrás, sendo cultivado desde a pré-história e inicialmente era usado no tratamento de várias doenças (Hamilton-Miller & Shah, 2005).

A planta do chá, *Camellia sinensis* antigamente era tratada como vegetal comestível, só mais tarde como bebida com diversas qualidades nutricionais e medicinais. Segundo a lenda, o chá foi descoberto pelo imperador chinês Shen-Nung, em 2737 a. C., quando as folhas da planta, acidentalmente, caíram para dentro de um pote com água a ferver (Awasom, 2011).

Entre 1100 e 200 a.C. a organização *Tradicional Chinese Medicine* (TCM) recomendou o consumo de chá e na dinastia de T'ang o chá surge como objecto de veneração e assim nasce o seu comércio na China. (Hamilton-Miller & Shah, 2005) Olhando para o século XII, a cerimónia *Cha No Yu* era o ritual mais conhecido entre os monges budistas. Também são relatadas tradições árabes em que o chá é a bebida mais popular, havendo crianças pelas ruas carregando bandejas e potes quentes, a distribuir chá quente e a vender em lojas (Awasom, 2011).

O cultivo de chá foi introduzido em Java e na Índia por volta do 1835 e só mais tarde no Sri Lanka, em 1870. O desenvolvimento do cultivo de chá na zona Este de África começou em 1920. Mas indica-se o século XVIII como a época de expansão comercial do chá, primeiro introduzido na Europa, pela companhia alemã do Este da Índia no início do século XVII e desta forma iniciou-se o comércio entre o oriente e o ocidente (Awasom, 2011).

Hoje em dia a planta *Camellia sinensis* é cultivada em mais de trinta países e a quantidade total de chá produzida e consumida no Mundo é de 78% de chá preto, 20% de chá verde e 2% de chá *Oolong*. (Chan, Soh, Tie, & Law, 2011). O chá é produzido de forma global e tornou-se um importante comércio, havendo economias em desenvolvimento dependentes do mesmo. (Awasom, 2011). Exemplo disso é a plantação de *Camellia sinensis* na localidade de Gorrêana, na Ilha de São Miguel nos Açores, onde existe a mais antiga plantação de chá na Europa, com exportação para todo o mundo.

O chá preto é consumido predominantemente no ocidente (Europa e EUA) e em alguns países da Ásia e é a bebida quente mais consumida na Turquia. Já o chá verde é consumido maioritariamente na China, Japão, Índia, Norte de África e Médio Oriente (Hamilton-Miler & Shah, 2005; Büyükbacı & El, 2008).

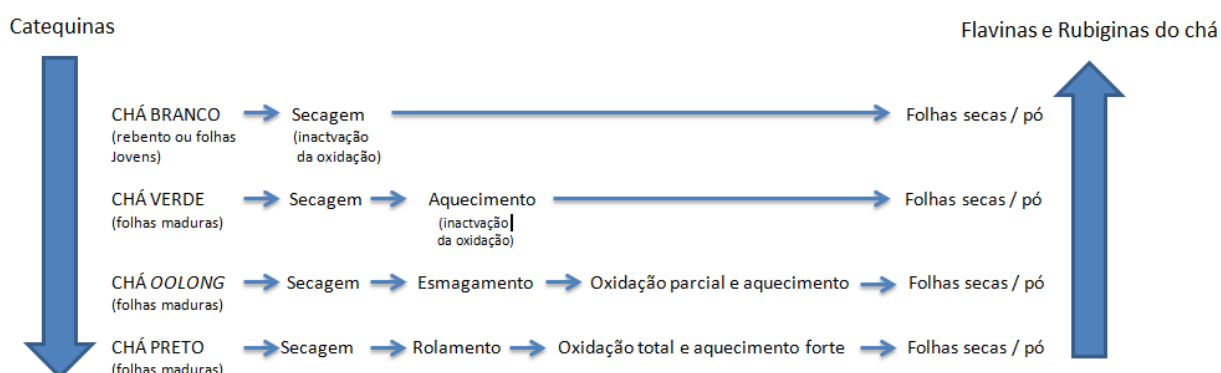
Devido ao facto do cultivo de chá requerer um clima demasiado húmido, os locais ideais de produção são o norte da Índia, Sri Lanka, Tibete e sul da China. Grandes diferenças na prática do cultivo de *Camellia sinensis* (época de colheita, idade das folhas, clima, ambiente industrial, processamento e armazenamento) são as causas de diversas alterações no chá seco (Hamilton-Miler & Shah, 2005).

As variedades do chá são normalmente designadas consoante a cor e geralmente influenciadas pelos mecanismos de processamento e níveis de oxidação. Os quatro passos principais que estão envolvidos na produção de chá, após a colheita da planta, são: secagem (retirar a humidade), rotação (quebrar as células para preparar a fermentação), fermentação (processo em que as folhas sofrem oxidação enzimática) e secagem (término da

fermentação). A variedade do chá é determinada pela execução total, parcial ou inexistente da fermentação (Awason, 2011).

O chá branco, verde, *Oolong* e preto são provenientes da mesma planta e são caracterizados segundo variações na plantação, processamento e oxidação dos polifenóis presentes nas folhas frescas de chá. Estes tipos de chá também diferem consoante a subespécie/variedade de *Camellia sinensis* que for utilizada para a produção. A figura 1 apresenta esquematicamente as variações na produção das diferentes variantes de chá (Unachukwu, Ahmed, Kavalier, Lyles, & Kennelly, 2010).

Figura 1 – Esquema do processo de extracção do chá (adaptado de Cooper, Morré, & Morré, 2005).

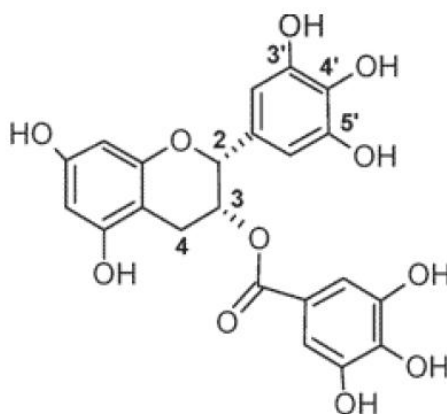


O chá branco sofre um processo de produção muito simples, que consiste apenas em secar as folhas muito jovens da planta (Chan, Soh, Tie, & Law, 2011; Awason, 2011).

Para a produção de chá verde as folhas frescas são vaporizadas de forma a prevenir a fermentação, originando um produto seco. O processo de vaporização impede que as enzimas responsáveis pela diminuição dos pigmentos das folhas exerçam a sua função e permite que o chá mantenha a cor verde durante todos os processos seguintes de manufactura  o. Este processo preserva os polifenóis naturais que têm efeitos benéficos para a saúde

(Chacko, Thambi, Kuttan, & Nishigaki, 2010). No processamento do chá verde as folhas são aquecidas de forma a inativar a enzima endógena, polifenol oxidase. Isto permite preservar as características monoméricas dos óleos flavonóides, conhecidos como catequinas. A catequina mais abundante e largamente estudada no chá verde é a galato de epigallocatequina (EGCG) (figura 2) (Vernarelli & Lambert, 2012).

Figura 2 – Estrutura química da EGCG (adaptado de Wang, Helliwell, & You, 2000).



As folhas para produção de chá *Oolong* sofrem uma fermentação parcial enquanto as do chá preto são totalmente fermentadas. Estas variações no processamento das folhas dão origem a alterações da cor e sabor, no chá. O chá *Oolong* tem excelentes características combinadas com a frescura do chá verde e a fragrância do chá preto. O chá *Oolong* tem uma oxidação de duas a três horas e esta é uma reacção natural, terminando com a mudança da cor e aroma (Chan *et al.*, 2011).

O processamento de chá preto requer uma fermentação. Assim, as folhas frescas são secas e esmagadas provocando um processo natural de oxidação. Deste processo são gerados constituintes polifenólicos de maior densidade, dando ao chá preto um sabor mais forte e tânico. (Hamilton-Miller & Shah, 2005) Durante o processamento do chá preto as enzimas endógenas são libertadas, havendo a formação de oligómeros de polifenóis e outro polímeros

como as flavinas e rubiginas do chá (Vernarelli & Lambert, 2012; Hamilton-Miller & Shah, 2005). As flavinas são compostos vermelhos-alaranjados responsáveis pelo sabor adstringente e cor acobreada do chá preto. As rubiginas são mais abundantes no chá preto e a sua estrutura e natureza química são desconhecidas (Chan *et al.*, 2011). O chá preto representa mais de 90% de todo o chá produzido, sendo a categoria de chá que sofre mais oxidação, com quatro horas de duração nesta etapa (Chan *et al.*, 2011).

1.2. Propriedades físicas, químicas e fisiológicas

O chá é a bebida mais consumida globalmente e estudos laboratoriais e epidemiológicos têm indicado vários benefícios desse consumo para a saúde do consumidor (Vernarelli & Lambert, 2012; Awasom, 2011). Os efeitos benéficos do chá afectam o estado de hidratação, doenças cardiovasculares, neoplasias, saúde dentária e consumo de ferro (nutriente essencial para o organismo humano) (Awasom, 2011).

O chá, tal como a água, ajudam a manter o equilíbrio hidrolítico do corpo, contribuindo para a saúde geral do organismo, não contendo sódio, gordura, hidratos de carbono ou açúcar. O chá contém flavonóides, substâncias antioxidantes que neutralizam os radicais livres, produzidos no organismo em consequência de reacções endógenas (Awasom, 2011).

As folhas de chá contêm tanina, a qual é responsável pelo aroma e cor, bem como cafeína e óleos essenciais que promovem o seu cheiro intenso e característico (Awasom, 2011). Também está presente no chá teanina (aminoácido 5-N-etil-glutamina, que atravessa a barreira hemato-encefálica, actuando como relaxante), teaflavina (originárias da polimerização dos polifenóis), teobromina, teofilina e ácido fólico (Hamilton-Miller & Shah, 2005). Da constituição química do chá ainda fazem parte minerais e microelementos (5% do peso seco) tais como, cálcio, magnésio, crómio, manganês, ferro, cobre, zinco, molibdénio, selénio, sódio, fósforo, cobalto, estrôncio, níquel, potássio, flúor e alumínio (Chacko *et al.*, 2010).

O chá e os seus polifenóis têm sido estudados de forma exaustiva devido às fortes potencialidades destas substâncias na prevenção do cancro, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e ainda outras condições crónicas. Laboratorialmente, estudam-se os efeitos que os polifenóis presentes no chá têm na prevenção da obesidade e síndromes metabólicas (Vernarelli & Lambert, 2012). O polifenol pertencente à família das catequinas e que é encontrado no chá é EGCG, em menor quantidade encontram-se outras catequinas: epicatequina (EC), galocatequina (GC), galato de galocatequina (GCG), epigalocatequina (EGC) e galato de epicatequina (ECG) (Hamilton-Miller & Shah, 2005).

Estudos realizados nos últimos 20 anos indicam que um terço do peso seco do chá verde ou preto é representado por polifenóis (Weisburger, 1999). Os polifenóis são bem conhecidos e tidos como excelentes antioxidantes, onde o chá verde tem muito mais potencial antioxidante que o chá branco ou preto. Estudos revelam que as propriedades antioxidantes do chá são atribuídas à presença das catequinas (Chan *et al.*, 2011). As catequinas presentes no chá apresentam um efeito protetor contra a infeção do vírus da imunodeficiência humana (HIV), mediado pela inibição da ligação dos viriões à superfície celular (Hamilton-Miller & Shah, 2005).

As substâncias presentes no chá também são conhecidas pela sua acção antibacteriana em que, genericamente, a actividade antimicrobiana diminui quando a fermentação das folhas do chá é mais prolongada (Chan *et al.*, 2011).

Estudos sobre a associação entre o consumo de chá e os marcadores para síndromes metabólicas em adultos levaram à conclusão que o consumo de chá quente está inversamente ligado à obesidade (diminuição do perímetro abdominal e do Índice de Massa Corporal (IMC)). O consumo de chá ainda revelou melhorias em bio marcadores de doenças cardiovasculares (aumento de lipoproteínas de alta densidade associadas a colesterol (HDL) e diminuição da proteína C reactiva (PCR)) (Vernarelli & Lambert, 2012).

O chá verde, preto e *Oolong* têm um papel importante na diminuição de glicose no sangue, no aumento da sensibilidade à insulina e no aumento da síntese de glicose em resposta à carência alimentar (Büyükbacı & El, 2008).

O chá preto e principalmente o chá verde têm sido estudados intensivamente devido à sua actividade antioxidante. O chá preto é menos antioxidante que o chá verde, provavelmente devido ao facto do processo de fermentação no chá preto ser total (Büyükbacı & El, 2008). Contudo, o chá preto também é conhecido pelas suas propriedades antioxidantes que se manifestam através da habilidade de expulsar radicais livres, inibir a peroxidação de lípidos e quelar os iões metálicos (Chan *et al.*, 2011).

O interesse e consumo de chá verde tem crescido e estudos recentes mostram que o consumo de chá verde está inversamente relacionado com a morte por acidente vascular e outras doenças cardiovasculares. O chá verde revelou uma capacidade antioxidante forte, sendo capaz de reduzir radicais livres, através da inibição da lipoperoxidação, prevenindo o aparecimento de doenças cardiovasculares (Ko *et al.*, 2011). Estudos detalhados mostram que os polifenóis presentes no chá verde e preto têm um particular benefício na inibição de reacções oxidativas *in vivo* e em diminuir os valores de peróxido de hidrogénio (Weisburger, 1999).

Uma das razões para o chá verde ser tão consumido no oriente durante séculos é sua propriedade calmante e curativa, capacidade provocada pela presença de L-teanina. O chá verde também potencializa a absorção de ferro. Contudo, esta capacidade de quelar o ferro é bem mais pobre no chá preto (Chan *et al.*, 2011; (Hamilton-Miller & Shah, 2005; Büyükbacı & El, 2008).

O chá branco tem sido classificado como tendo actividade antioxidante, mas ainda está relacionado com a inibição da actividade das enzimas elastase e collagenase, sugerindo a promoção de pele mais elástica e forte e o alívio de inflamação e artrite reumatóide. O chá branco ainda merece relevo na sua actividade lipolítica, inibindo a adipogénese (Unachukwu *et al.*, 2010).

Como qualquer produto alimentar plantado e processado, quer manualmente quer industrialmente, está sujeito a possíveis contaminações. A bioacumulação de metais pesados é estudada em diversos alimentos. A acumulação de metais em tecidos vegetais, como é o caso da planta *Camellia sinensis*, depende de vários factores: (1) a subespécie da planta, em que os metais têm mais tendência a concentrar-se primeiramente nas raízes,

evidenciando o papel crucial do sistema solo-planta na protecção da cadeia alimentar; (2) factores relacionadas com o solo, tanto o pH como a quantidade de matéria orgânica presente no solo; (3) factores externos, como a temperatura, luminosidade, humidade, aplicação de agentes fertilizantes e protectores (Mídio, 2000).

2. METAIS

2.1. Considerações gerais

O estudo da concentração de metais em alimentos é importante quer do ponto de vista nutricional, tecnológico e/ou toxicológico.

Alguns metais são essenciais à dieta diária devido ao facto do seu valor nutricional ou então por estarem relacionados com funções fisiológicas. Metais como o ferro, cobre, zinco, cobalto e manganês são metais essenciais já que participam em sistemas biológicos de regulação do organismo. Por sua vez, o mercúrio, chumbo, cádmio, entre outros, são considerados metais não essenciais, sendo tóxicos em determinadas concentrações (Liang, 2003).

Tendo em conta a natureza dos alimentos, existe sempre uma forte possibilidade de se ingerirem metais tóxicos, daí ser essencial definir os limites e condições de exposição seguras (Mídio, 2000).

Considera-se um metal como tóxico aquele que pertence a um grupo de elementos que não possui características benéficas ou essenciais para o organismo, produzindo efeitos danosos para as funções metabólicas normais, mesmo quando em quantidades vestigiais. Os efeitos tóxicos são classificados segundo (1) a gravidade dos sinais e sintomas (leve, moderado ou severo), (2) rapidez de ocorrência (agudo, subagudo, subcrónico ou crónico) e (3) local de acção (sistémico ou local) (Mídio, 2000).

Os alimentos são considerados misturas complexas de substâncias nutricionais e não nutricionais, consumidos na forma natural ou processada. Algumas dessas substâncias só são seguras quando presentes em baixas concentrações e se a ingestão for de fraca frequência. Assim, estabelece-se o limite máximo de consumo, traduzido no conceito de ingestão diária aceitável (IDA). Para a maioria dos agentes químicos presentes nos alimentos é perfeitamente possível calcular a IDA, podendo-se afirmar-se como a quantidade de um agente químico presente nos alimentos que pode ser

ingerido através da dieta, diariamente, durante toda a vida do indivíduo, sem provocar risco de intoxicação (Mídio, 2000).

Os metais são utilizados frequentemente em indústrias e representam um grave problema de poluição. A intoxicação por metais pesados tornou-se uma preocupação para a saúde pública.

No organismo humano a maioria dos metais é proveniente da dieta em que as quantidades que serão absorvidas e retidas dependem das características físico-químicas do metal, da composição do alimento, do estado nutricional e de factores genéticos do organismo exposto (Mídio, 2000).

A concentração dos metais nos alimentos, independentemente da sua origem, é função das condições ambientais de onde o alimento foi produzido bem como das técnicas usadas no seu processamento e das condições de armazenamento (Mídio, 2000).

O presente estudo incide sobre sete metais (alumínio, arsénio, cádmio, chumbo, cobre, crómio e selénio) visto terem sido os metais quantificados em diversos estudos semelhantes, contudo referentes a outros chás e a outros locais do globo.

2.2. Alumínio

O alumínio e os seus compostos são os principais constituintes da crosta terrestre, já que esta é constituída por cerca de 8% deste metal. É o terceiro elemento mais abundante (depois do oxigénio e silício) e, assim, o elemento metálico predominante, encontrado em combinação com o oxigénio, flúor, silício, enxofre e outras espécies; não ocorre naturalmente no estado elementar (ATSDR, 2008).

O alumínio é lançado e disperso no ambiente por processos naturais e como consequência da actividade humana. A mobilização de fontes naturais e a deposição de precipitados provenientes de chuvas ácidas também são caudas da abundância de alumínio no planeta (INCHEM, 1997). Lançamentos antrópicos directos de compostos de alumínio ocorrem principalmente no ar e

estão associados a processos industriais. Assim, a mineração e processamento e minérios de alumínio e a produção do próprio metal, ligas e compostos podem levar à libertação desses compostos no ambiente. O uso de alumínio e dos seus compostos em processamento, embalagem e armazenamento de produtos alimentares e como floculante no tratamento de água potável pode contribuir para a sua presença na água potável e alimentos. (ATSDR, 2008)

Embora a dieta compreenda a fonte primária (> 90%) de alumínio para o ser humano, existem muito poucos dados sobre a biodisponibilidade oral de alumínio proveniente de alimentos ou bebidas que não sejam água. (Gräske *et al.*, 2000)

A planta do chá chega a ser considerada um acumulador de alumínio e esta acumulação vai provocar um especial aumento da concentração em plantas de mais idade. Um factor importante para os valores de concentração de alumínio no chá é o tipo de solo onde este é cultivado. Tem sido sugerido que o alumínio em folhas de chá tem baixa biodisponibilidade oral, em que 91 a 100% do alumínio é detectado sob a forma de complexos orgânicos (Gräske *et al.*, 2000; Hayacibara, Queiroz, Pereira, Tabchoury, & Cury, 2004; Shu, Zhang, Lan, & Wong, 2003).

A biodisponibilidade do alumínio proveniente da dieta foi estimada em 0,1 a 0,3%, baseada na dose diária de alumínio e na eliminação urinária do mesmo. Estudos que assentam no controlo da dieta e consumo de chá tornam mais consistentes estes valores (ATSDR, 2008). (Street & Drábek, 2007) afirma que grande parte do alumínio presente no chá encontra-se ligada a compostos fenólicos, ligação que provoca uma diminuição na biodisponibilidade oral.

O alumínio está associado a alguns problemas neurológicos e o limite de 1mg Al/kg peso corporal/dia é considerado a dose diária aceitável (WHO, 2012).

Os tecidos que apresentam uma maior concentração de alumínio são o pulmão e o osso, sendo que último é tido mesmo como um depósito deste metal (Jouhanneau *et al.*, 1997).

A absorção de alumínio no trato gastrointestinal provoca a inibição da absorção de outras substâncias essenciais, tais como os fluoretos, compostos

de cálcio e ferro (Jouhanneau *et al.*, 1997). Assim sendo, o alumínio pode interferir com o metabolismo do cálcio em vários sistemas orgânicos, incluindo o cérebro (Birchall & Chappell, 1989).

Existem diversos estudos que indicam quer efeitos adversos quer patologias associadas a intoxicações por alumínio. O elevado consumo de chá com elevadas concentrações de alumínio pode provocar efeitos hepatotóxicos e neurotóxicos. Também em doentes renais os efeitos adversos da presença de alumínio são estudados, em que a anemia, doenças óssea e encefalopatia de diálise são as complicações mais comumente relacionadas com a exposição de alumínio (ATSDR, 2008).

2.3. Cádmio

O cádmio é um metal relativamente raro que se encontra presente na crosta terrestre, numa concentração de 0,5 µg/g. Este metal é utilizado para protecção de revestimentos em aço e em ligas metálicas, e ainda faz parte de pigmentos para tintas e plásticos. O cádmio ainda é usado em baterias recarregáveis, aplicadas em aparelhos portáteis, de leve peso, como computadores e telemóveis (Taylor & Francis, 2000).

O cádmio é mais facilmente encontrado na forma iónica livre na água, enquanto no alimento o ião geralmente existe complexado com uma variedade de ligantes, incluindo proteínas como a metalotionina.

A principal fonte de exposição de cádmio, para não fumadores, é a alimentação e a população que consome regularmente carne e marisco sofrerá uma maior exposição. Alguns vegetais como a alface, espinafres, batatas, grãos, amendoim e soja podem conter altos níveis de cádmio (Taylor, DeWoskin, & Ennever, 1999).

Ingerir alimentos ou água potável com níveis muito elevados de cádmio é severamente irritante para o estômago, causando vômitos e diarreia. A exposição crónica, pela alimentação, ao cádmio, pode levar à acumulação do metal nos rins e osso, alterando o normal funcionamento destes órgãos e

tecido. Alguns estudos indicam mesmo o rim como o principal órgão-alvo da exposição oral prolongada ao cádmio. No osso verifica-se osteomalacia, osteoporose, fracturas e densidade óssea diminuída. Hematologicamente é de referir que o cádmio interfere directamente com a normal absorção e disponibilidade biológica do ferro, provocando assim o aparecimento de anemias ferropénicas (Taylor & Francis, 2000; Taylor *et al.*, 1999).

2.4. Chumbo

O chumbo é dos metais mais comuns na natureza, sendo encontrado e apresentando toxicidade para a grande maioria dos sistemas biológicos, já que ainda não foram encontrados benefícios em nenhuma actividade biológica. Contudo, o que é discutível na toxicidade do chumbo é a dose a partir da qual se torna realmente tóxico.

O aparecimento de chumbo no meio ambiente é devido principalmente à industrialização e ao uso de combustíveis que o contêm, sendo detectado na grande maioria das vezes como sulfureto de chumbo (ATSDR, 1999).

A alimentação é a fonte ambiental que pode levar a exposições mais excessivas e graves, devido à utilização de chumbo nos diversos utensílios de produção e processamento dos alimentos (Casarett & Doull's, 2008).

Associados à toxicidade do chumbo são descritos efeitos ao nível do sistema nervoso, em que a idade e as circunstâncias do hospedeiro são os principais factores para a severidade dos sintomas. O facto de o chumbo ser uma substância que consegue atravessar a barreira hemato-encefálica explica os efeitos gerados após a exposição ao metal, estando assim relacionado a encefalopatias e paralisias cerebrais.

2.5. Cobre

O cobre é um metal avermelhado que é encontrado em rochas, solos, água, sedimentos e, em baixos níveis, no ar. A concentração média na crosta terrestre é cerca de 50 partes por milhão (ppm). O cobre é um elemento essencial para todos os organismos vivos conhecidos, incluindo o homem, contudo em níveis muito mais elevados, são detectados efeitos tóxicos.

Este metal é bastante utilizado em fiação eléctrica e tubagens, e ainda em ligas metálicas. Alguns compostos de cobre são utilizados ainda como fungicidas em agricultura, ou como conservantes de madeiras, couros e tecidos.

O cobre é comum no ambiente, sendo fácil a sua exposição, por inalação do ar e consumo de água e alimentos. Estudos indicam a presença de elevadas concentrações de cobre em muitos alimentos e água, em que os compostos, como o sulfato de cobre, utilizados na agricultura são aqueles que mais ameaçam a saúde do consumidor (Araya *et al.*, 2004).

A presença de cobre em alimentos é natural e aceitável desde que se obedeça aos limites máximos de exposição por consumo, sendo mesmo afirmado pela *Environmental Protection Agency* (EPA) que pode ser consumido 1mg de cobre por dia. No entanto, a quantidade ingerida geralmente não excede o valor aceitável (ATSDR, 2009).

O cobre é um nutriente essencial que é incorporado num número de metaloenzimas envolvidas na formação da hemoglobina, metabolismo de hidratos de carbono, metabolismo de drogas/xenobióticos, biossíntese de catecolaminas, o *cross-linking* de colagénio, elastina, queratina e o mecanismo de defesa antioxidante. No entanto, a exposição a doses elevadas torna-o tóxico, afectando diversos órgãos e tecidos, dependendo da via de exposição. Aquando da exposição oral, quer por ingestão de água ou alimentos que contenham cobre em elevadas concentrações são descritas náuseas, vômitos, dores de estômago ou diarreia. Exposições de cobre em concentrações extramente altas e agudas podem causar danos no fígado, rins, danos oxidativos e até mesmo a morte. Apesar de se verificarem alguns níveis de toxicidade, o organismo humano parece ser capaz de bloquear a entrada de

cobre na corrente sanguínea, sendo excretado nas fezes e urina (Fewtrell, Kay, & MacGill, 2001; Gaetke, 2003; Zietz, 2003; Zietz et al., 2003).

2.6. Crómio

O crómio é usado para produção de ligas metálicas tal como o aço inoxidável. Os sais de crómio são utilizados em curtumes, pigmentos, agentes anti-corrosão e soluções de galvanoplastia. Apesar da maioria das ligas metálicas que contêm crómio serem inertes, a dissolução do metal proveniente das ligas é talvez a maior fonte de crómio nos alimentos (Taylor & Francis, 2000).

O crómio é considerado como um elemento essencial para o Homem, sendo a dose diária recomendada de 120 µg, pela FDA. Cerca de 0,5% da dose administrada de crómio inorgânico (crómio III) é absorvido, enquanto a absorção de crómio orgânico é ainda maior (ATSDR, 1989).

2.7. Arsénio

O estudo toxicológico do arsénio não é fácil de caracterizar devido à sua complexidade química e ao elevado número de composto de arsénio. De forma geral a toxicidade do Arsénio (III) é cerca de sessenta vezes superior à do arsénio (V) e as formas inorgânicas deste metal são ainda mais tóxicas que as orgânicas (Jain & Ali, 2000).

O arsénio é classificado quimicamente como metalóide já que apresenta características de metal e de não-metal. Genericamente, é tratado como um metal e apresenta-se sob a forma de sólido cinzento, quando se encontra na sua forma elementar. No ambiente encontra-se conjugado com outros elementos como o oxigénio, cloro, enxofre, carbono e hidrogénio (ATSDR, 2000).

O aparecimento de formas inorgânicas de arsénio deve-se principalmente ao aquecimento de minérios de cobre e chumbo, em fundições. O arsénio é libertado para a atmosfera sob a forma de pó muito fino.

Actualmente os compostos inorgânicos de arsénio não podem ser utilizados em pesticidas, na agricultura, tendo sido substituídos pelos compostos orgânicos deste metal, com o ácido cacodílico e metilarseniato dissódico. O arsénio, na sua forma metálica, é adicionado em pequenas quantidades a outros metais para formar ligas metálicas com melhores propriedades, como as ligas usadas em baterias de chumbo para automóveis. O arsénio ainda é utilizado em semicondutores e díodos emissores de luz (ATSDR, 2000).

Os alimentos são normalmente a maior fonte de arsénio, em que o marisco é o alimento com maiores concentrações descritas, seguido de cereais/arroz, cogumelos e aves (Casarett & Doull's, 2008).

A exposição crónica a compostos de arsénio é a mais estudada, devido ao facto de este tipo de exposição provocar efeitos muito graves no sistema nervoso periférico e central. A neurotoxicidade começa com pequenas alterações sensoriais, progredindo com o tempo e com a contínua exposição, até causar neuropatia periférica. A desmielinização dos axónios é o efeito mais grave relacionado com a intoxicação de arsénio. A exposição aguda provoca episódios de parestesia e desregula a função motora durante alguns dias (Casarett & Doull's, 2008).

A principal via de excreção do arsénio é urinária, em que 50% da dose ingerida é eliminada por esta via. Na pele, pelos e unhas também foram encontradas doses do metal (Jain & Ali, 2000).

2.8. Selénio

O selénio é encontrado na natureza em diferentes estados de oxidação: seleniato (Se^{6+}), selenito (Se^{4+}), selénio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{2-}). A análise da sua forma química, solubilidade, disponibilidade e potencial tóxico

são parâmetros interessantes de estudo visto que este composto provoca efeitos adversos nos organismos vivos, quer em excesso quer em carência (Yusuf, Rehman, & Casscells, 2002).

A alimentação constitui uma fonte diária de selénio, em que o camarão, carne, lacticínios e cereais são os que fornecem a maior quantidade (WHO, 2012).

A forma Se^0 não é absorvida pelo sistema gastrointestinal, enquanto a absorção de Se^{4+} é feita no duodeno. Os selenitos metálicos de arsénio, cádmio, cobre e mercúrio apresentam baixa solubilidade afectando a absorção, metabolismo, distribuição e excreção do selénio. Devido à sua insolubilidade estas formas são descritas como selénio inerte e inactivo. As formas de Se^{6+} são as que apresentam mais solubilidade e em semelhança com os sulfatos, estes compostos são rapidamente absorvidos e transportados pelos sistemas biológicos (WHO, 2012).

A enzima glutathione peroxidase, nas suas quatro formas catalíticas apresenta na sua constituição a selenocisteína, facto importante para o selénio ser considerado um micronutriente. A função da glutathione peroxidase no sistema fisiológico é a degradação de peróxidos celulares, protegendo os lípidos membranares e possivelmente as proteínas e ácidos nucleicos de danos oxidativos. Outra enzima que se relaciona directamente com as concentrações de selénio é a hemeoxidase que, para o seu normal funcionamento normal necessita de concentrações determinadas de selénio. Assim, a presença de selénio no sistema biológico está ligada com actividades antioxidativas, de prevenção e homeostasia da fisiologia das células, estando relacionado com as concentrações de outros nutrientes, como o zinco, ferro, cobre, manganês e vitamina E (Casarett & Doull's, 2008).

O facto de serem relatados efeitos adversos quer pelo excesso, quer pela carência de selénio na alimentação determina que o estudo de avaliação de risco inclua estas duas possibilidades, até porque o intervalo entre a óptima nutrição e toxicidade é muito curto (Casarett & Doull's, 2008).

3. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.1. Preparação de amostra

A aplicação de técnicas de preparação de amostra para análise de metais em alimentos, como a digestão por inceneração, habitualmente conjugada com a adição de ácidos, e a digestão ácida, de preferência apoiada pela energia de microondas, tem sido bastante estudada e melhorada. As técnicas mais antigas de digestão implicavam um gasto exagerado de reagentes, geração de resíduos perigosos e ainda provocavam contaminações na amostra. Durante as últimas décadas, avanços no estudo da preparação de amostras de alimentos, proporcionaram o progresso da digestão ácida assistida por microondas e por sistemas de ultra-sons, da extracção e preparação das suspensões, e por fim da análise directa de amostras sólidas (Arruda, 2007; Buldini, Ricci, & Sharma, 2002; Andrade et al., 2008).

As técnicas de preparação de amostra para a análise de metais que consistem na inceneração das amostras, sucedidas de dissolução das cinzas obtidas em ácidos, são bastante aplicadas no doseamento de metais em alimentos. A principal vantagem de usar pouca quantidade de amostra (0,1 a 1 g), e a remoção da matéria orgânica pela decomposição térmica, usando mufla, tornam este método simples e relativamente rápido. As temperaturas variam entre 450 e 550°C e os resíduos deste aquecimento são dissolvidos em ácidos apropriados. O grau de volatilização dos elementos é uma limitação do processo e depende da temperatura aplicada, o estado em que o metal se encontra na amostra e o ambiente químico aquando do aquecimento. Reagentes oxidantes podem ser usados para prevenir a volatilização de alguns analitos e também aceleram o processo (nitrato de magnésio e óxido de magnésio, de elevado grau de pureza, são exemplos de oxidantes). Santos, Gramacho, Teixeira, Costa, & Korn, 2008 indicam o bloco de aquecimento, ou mufla, como o mais importante passo para serem alcançadas as condições óptimas de determinação. Outros parâmetros como o ácido escolhido, as

quantidades usadas de ácido e o tempo de duração da digestão foram estudados e relacionados com a eficácia do método (Hoenig, 2001).

A aplicação de microondas à digestão com ácido nítrico (HNO_3), ácido perclórico (HClO_3) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2) tem sido descrita por vários autores para destruir matéria orgânica, incluindo a separação dos compostos organometálicos presentes na grande maioria das amostras alimentares, tornando-se assim no método de preparação mais utilizado para a digestão de alimentos. As principais vantagens da utilização de microondas prendem-se com os baixos tempos de espera e a redução na quantidade de reagentes necessários à digestão completa. Esta técnica ao usar um vaso fechado permite diminuir em muito o grau de contaminação da amostra, acelera o processo devido ao simultâneo aumento de pressão e ainda diminui a perda de compostos voláteis (Arruda, 2007; Mindak & Dolan, 1999).

Um estudo comparativo, realizado por Soylak, Tuzen, Narin, & Sari, 2004 relevou que a digestão ácida sem o uso de microondas é mais demorada do que aquando da sua utilização, contudo sem fazer variar a eficácia da digestão. Assim, o uso de microondas permite uma melhor e segura digestão, livre de contaminações (Soylak et al., 2004).

A extracção ultrasónica tem sido bastante estudada e a aplicação de radiação por ultra-sons para a determinação de espécies metálicas em alimentos é cada vez mais utilizada. Esta técnica tem como principal vantagem a rapidez de realização e ainda uma diminuição muito acentuada na quantidade de reagentes, comparativamente às técnicas termoquímicas descritas atrás (Krishna & Arunachalam, 2004).

A técnica de preparação de suspensões tem sido considerada uma óptima variante ao uso directo da amostra no estado sólido, já que é possível fazer diluições à própria amostra. Assim, esta técnica apresenta quer as vantagens das técnicas de preparação de amostras em meio líquido quer das técnicas em meio sólido. Uma outra vantagem destaca-se pelo facto de existirem soluções padrão no mesmo estado físico da suspensão. Contudo há que ter em conta a estabilização da suspensão, a sua homogeneidade, o tamanho e sedimentação das partículas (Andrade et al., 2008).

A técnica que utiliza a amostra no seu estado sólido é a mais antiga para a determinação de metais por espectrometria, usando espectros de emissão em conjunto com espectrometria de fluorescência por raios-X. Algumas determinações podem ser feitas usando a amostra sólida, através de espectrometria de absorção atômica (EAA), espectrometria por emissão com plasma de acoplamento indutivo (ICP-AES) e espectrometria de emissão com plasma de argon indutivamente acoplado com espectrometria de massa (ICP-MS). A espectrometria de absorção atômica com câmara de grafite (GFAAS) foi considerada como a que apresenta mais vantagens na utilização de amostras sólidas, talvez por não ser necessária a utilização do sistema de nebulização. Ainda se refere como uma técnica de baixa precisão, com resultados de precisão superiores a 10%, devido à não homogeneidade natural das amostras (Maduro *et al.*, 2006; Júnior, Krug, Pereira, & Korn, 2006).

3.2. Espectrometria de Absorção Atômica

A espectrometria atômica inclui quatro subtipos de análise, espectrometria por emissão com chama (FAES), EAA, ICP-AES e espectrometria de fluorescência atômica.

A espectrometria atômica tem como fundamento físico o fornecimento de energia a um átomo, suficiente para provocar a passagem de um electrão do nível energético E_0 para o nível E^* e, assim, o átomo absorver uma determinada quantidade de energia ($\Delta E = E^* - E_0$). A energia cedida pode ser do tipo térmico, eléctrico e ou a junção dos dois (termoeléctrico).

O tempo em que o átomo fica no estado excitado é da ordem de grandeza dos nanossegundos, regressando de novo ao estado E_0 . Esta transição ocorre quando o átomo excitado cede a energia ao meio, energia correspondente a $E^* - E_0$, que é emitida na forma de radiação. A radiação emitida é caracterizada por uma frequência, comprimento de onda e número de onda.

A radiação detectada origina espectros em que a qualidade destes depende do número de átomos que existe no nível do qual se dá a transição e voltam ao estado fundamental de energia.

Em absorção atômica os átomos estão em condições de absorver energia fornecida por exemplo por radiação de frequência ressonante com a transição electrónica respectiva, enquanto que em emissão atômica os átomos tem de se encontrar em estados de energia, superior ao fundamental, onde possam emitila (Lajunen & Peramaki, 2004).

Os métodos de espectrometria atômica utilizam radiação electromagnética que é absorvida ou emitida pelos átomos da amostra de forma a obter-se informações das amostras em estudo, quer de forma qualitativa, quer quantitativa. A informação quantitativa é fornecida pela quantidade de radiação electromagnética que é absorvida ou emitida. Mais especificamente em absorção atômica, a radiação de comprimento de onda característico do elemento em estudo é emitida através de vapor atômico (lâmpada constituída pelo elemento em análise). Os átomos do elemento absorvem alguma desta radiação e a quantidade de radiação absorvida por estes é medida e usada para determinar a concentração do elemento na amostra estudada, aplicando a Lei de Lambert-Beer. Enquanto em emissão atômica é detectada a radiação emitida pelo analito após ser devidamente excitado para níveis de energia superiores (Csuros & Csuros, 2000).

Para o estudo de metais os métodos mais descritos são a GFAAS, espectrometria de absorção com geração de hidretos (HGAAS), ICP-AES e ICP-MS. Ressalvando todas as diferenças dos vários métodos, a que mais se pode sublinhar é a sensibilidade, descrita pelo limite de detecção. A tabela 1 mostra a comparação dos quatro métodos.

Tabela 1 – Comparação de parâmetros técnicos de diferentes métodos utilizados para determinação de espécies metálicas. (adaptado de Bolann *et al.*, 2007)

Parâmetro	GFAAS	GHAAS	ICP-AES	ICP-MS
Limite de Detecção (LD) ($\mu\text{g/L}$)	<0,01-10	0,01-10	0,1-100	<0,001-10
Faixa dinâmica (ordens de linearidade. Potência de 10)	2-3	2-3	5-7	5-7
Rapidez de execução	Lento	Lento	Rápido	Rápido
Custo do equipamento	Intermédio	Baixo	Alto	Muito Alto
Automatização	Sim	Sim	Sim	Sim
Elementos de análise	Sequencial	Sequencial	Simultâneo/Sequencial	Simultâneo/Sequencial
Interferências	Razoavelmente bem identificadas	Bem identificadas	Bem identificadas	Bem identificadas, mas dificuldade de correcção
Facilidade de uso	Fácil	Requer experiência	Requer experiência	Requer elevada experiência
Padrão interno	Não usado	Não usado	Usado	Usado

Em técnicas de absorção atômica as principais fontes de radiação utilizadas são lâmpadas de cátodo oco e lâmpadas de descarga sem eléctrodos (edl).

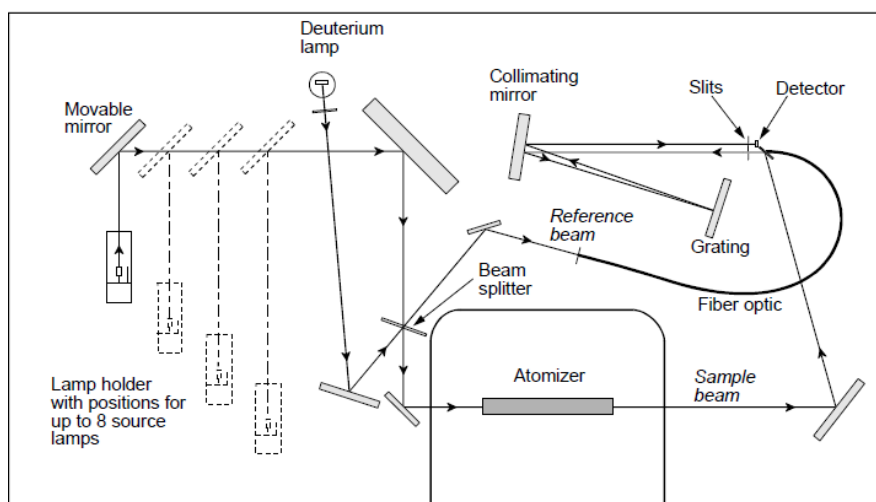
As lâmpadas de cátodo oco consistem num ânodo de tungsténio e um cátodo cilíndrico selado num tubo de vidro preenchido com néon ou argon. O cátodo é construído pelo metal que se quer determinar. A ionização do gás inerte ocorre quando é aplicado um potencial da ordem de 300V, através de eléctrodos, o que gera uma corrente variável, dependendo dos iões e electrões que migram para o eléctrodo. Quando o potencial é suficiente, os catiões gasosos adquirem energia cinética suficiente para expelir alguns átomos metálicos da superfície do cátodo e produzir a nuvem atômica. Uns átomos metálicos removidos encontram-se no estado excitado e acabam por emitir radiação de comprimento de onda característico quando retomam ao estado fundamental de energia. A eficiência da lâmpada de cátodo oco depende

directamente da sua geometria e do potencial que lhe é aplicado (Skoog & West, 1971).

A utilização de edl passa pelo facto de estas fornecerem níveis de intensidade uma ou duas vezes maiores que as de cátodo oco. Este aumento de intensidade origina uma melhoria do sinal/ruído, diminuindo assim os limites de detecção e aumentando a sensibilidade. As edl são constituídas por um tubo de quartzo selado com algum gás inerte e uma pequena quantidade de metal (ou o seu sal) que se pretende estudar. A ionização do gás ocorre através do fornecimento de iões que são acelerados por um campo electromagnético de alta frequência, de forma a ganharem energia suficiente para excitar os átomos do metal (Skoog & West, 1971).

O sistema óptico do espectrómetro está esquematizado na figura 3 abaixo apresentada. A radiação proveniente da lâmpada escolhida é direccionada para o atomizador através de um conjunto complexo de espelhos. A radiação gerada após a atomização também é dirigida até ao fotomultiplicador através de espelhos.

Figura 3 - Esquema do sistema óptico utilizado (adaptado do Manual do equipamento da PerkinElmer)



A análise dos metais presentes no chá foi realizada através de dois métodos de absorção atômica, o GFAAS e o HGAAS. A selecção destes dois métodos teve por base os equipamentos existentes no laboratório de Métodos Instrumentais, os conhecimentos teóricos de cada método, mas também outros factores importantes, tais como: o tipo de analito a determinar, o tipo de informação que se quer obter (quantitativa), o tipo de amostra e a proporção dos seus constituintes, o custo inerente ao estudo, o tempo necessário para analisar cada amostra, as dificuldades devido à contaminação, as interferências analíticas, exactidão e precisão. O método de GFAAS foi utilizado para a determinação de alumínio, cádmio, chumbo, cobre e crómio, enquanto o HGAAS foi utilizada para o arsénio e selénio.

3.2.1. Espectrometria de Absorção Atômica com câmara de grafite

O equipamento de GFAAS utilizado neste estudo está apresentado na figura 4.

Figura 4 – Espectrómetro de Absorção Atômica com câmara de grafite.



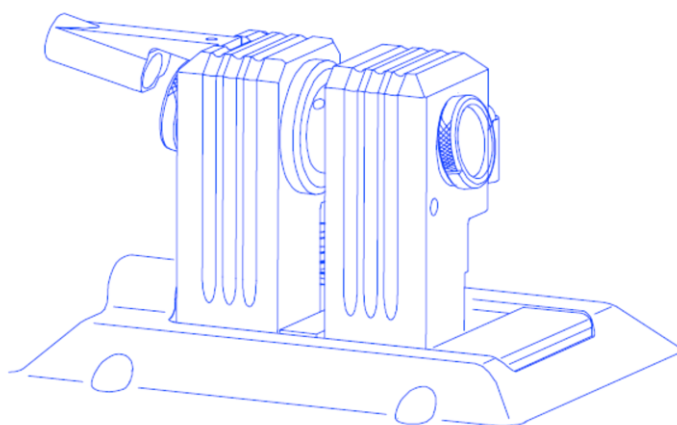
A especificidade deste método depara-se com a utilização de um tudo de grafite onde é gerada a atomização do metal. A amostra é, de forma automatizada, introduzida na câmara (20 μ L), onde irá ser exposta a um determinado programa de temperaturas elevadas, para que o metal sofre a variação do estado de energia.

A fonte de radiação usada é a lâmpada de cátodo ou as edl, específicas de cada metal doseado.

O monocromador é um sistema de selecção de comprimento de onda, capaz de distinguir a risca do espectro seleccionado de outras geradas. A detecção é feita e resulta no espectro de absorção.

A atomização é gerada num sistema que está representado na figura 5, onde se encontra no seu interior a câmara de grafite, com o respectivo circuito eléctrico que permite o controlo eficaz da temperatura, tubagem de circulação de água fria para conduzir ao arrefecimento rápido e fluxo de árgon interno e externo para manter o tubo de grafite livre da presença de oxigénio.

Figura 5 – Atomizador usado em GFAAS (adaptado do Manual do equipamento, PerkinElmer).



A câmara de grafite é constituída por grafite pirolítica e está na posição exacta onde passa a radiação externa. A oxidação do tubo é evitada pelo revestimento com o fluxo interno de gás inerte, prevenindo ainda a formação

de óxidos metálicos. O fluxo de gás interno também permite purgar os vapores gerados pela matriz da amostra.

A selecção do programa de temperaturas varia com o tipo de matriz da amostra em estudo, mas em sistemas recentes já se encontram programas pré-definidos, facilitando este passo. O processo de atomização é bastante específico para cada substância e tem muito em conta as características físico-químicas do analito em estudo. Contudo fazem parte deste processo quatro etapas que são comuns em todas as determinações, que são: a secagem, pirólise, atomização propriamente dita e limpeza. A secagem consiste na remoção do solvente da amostra, utilizando temperaturas próximas ou superiores à de ebulição do solvente. Há que ter em conta que este aumento de temperatura não pode ser brusco, usando-se rampas de aquecimento, para que não haja projecção de amostra nas paredes da câmara, e assim provocar uma diminuição da sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados. Na pirólise é destruída toda a matriz da amostra excepto o metal a determinar. Neste passo tenta-se utilizar uma temperatura muito elevada, mas que não altere o analito. A utilização de modificadores químicos da matriz pode melhorar a sensibilidade do método, já que permite a utilização de temperaturas mais baixas. A atomização é o passo crucial em que a câmara é levada exactamente à temperatura de atomização do metal, durante apenas alguns segundos. O último passo é a limpeza do tubo, que consiste em aplicar temperaturas muito elevadas, durante uns segundos, de forma a serem eliminados quaisquer possíveis efeitos de memória.

3.2.1.1. Interferências

As interferências que são descritas em GFAAS têm relação directa com alterações na estabilidade de todo o método. As interferências de natureza física estão relacionadas com variações na introdução de amostras, sinais de *background* e efeitos de memória. Já as interferências de ordem química são causadas por reacções inesperadas do analito com a matriz da amostra, como

material da câmara ou ainda com o gás inerte utilizado (Lajunen & Peramaki, 2004).

3.2.1.1.1. Interferências físicas

O estado físico das amostras a analisar é o maior problema causador de interferências físicas. As amostras que apresentem viscosidade ou tensões superficiais diferentes das soluções-padrão irão ter erros associados à leitura das concentrações do analito. As variações no estado físico da amostra implicam que haja diferenças nos volumes de amostra que são pipetados ou ainda a dispersão da amostra pode ter comportamentos diferentes na fase de secagem do processo de atomização. De forma a minimizar estas interferências deve-se previamente eliminar os componentes da matriz que provoquem as alterações no estado físico, ou então proceder-se à diluição da amostra ou ainda utilizar o método de adição de padrão.

Em espectrometria está inerente o aumento do sinal através da absorção não específica (*background*). Este tipo de absorção é causado pela presença no atomizador de outras espécies que absorvem radiação no mesmo comprimento de onda do analito. De forma a eliminar esta interferência o equipamento deverá dispor de um sistema de correcção, por exemplo a lâmpada de deutério.

Os efeitos de memória estão relacionados com uma limpeza deficiente da câmara de grafite. Este efeito negativo é minimizado ou até mesmo eliminado se forem aplicadas temperaturas elevadas na fase de limpeza, embora isto implique uma diminuição do tempo de uso da câmara.

3.2.1.1.2. Interferências químicas

Das interferências de ordem química a mais frequente é a formação de monohalogenados gasosos que provêm da matriz da amostra. A presença de halogenetos, principalmente cloretos, é muito frequente em amostras

analisadas por GFAAS, principalmente amostras de origem geológica. O anião cloreto, encontrado-se em quantidades elevadas nas amostras, origina a formação de cloretos voláteis do analito, que serão perdidos na fase da pirólise e que a sua dissociação na atomização é incompleta, havendo assim uma menor diminuição da absorção e obrigatoriamente erro ou incerteza na concentração calculada. A forma mais simples e adequada de minimizar estes efeitos é a utilização de modificadores de matriz.

Os modificadores de matriz são soluções que se adicionam à amostra imediatamente antes da sua introdução na câmara e devem ser mais voláteis que a mesma, de forma a serem eliminados mais facilmente que o analito. A utilização de modificadores tem como objectivo estabilizar os analitos para as altas temperaturas e tornar possível a remoção da matriz antes da fase de atomização. A escolha do modificador deve ser feita tendo em conta alguns factores: ser efectivo para o maior número de elementos que se pretendem analisar, não causar aumentos no sinal de *background*, não diminuir o tempo de vida da câmara de grafite, possuir um elevado grau de pureza, ter um nível de toxicidade o mais baixo possível e ser eficaz (inibindo o efeito dos elementos da matriz que não se pretendem quantificar) no método aplicado (Li & Fang, 2012).

3.2.1.2. Vantagens e desvantagens

Este método apresenta como vantagem principal a possibilidade de dosear analitos em concentrações de $\mu\text{g/L}$. Os limites de detecção baixos, volumes de amostras mínimos e a não formação de óxidos são outros pontos vantajosos. Em comparação com a espectrometria de emissão com chama, a GFAAS permite introdução directa da amostra elimina a interferência das propriedades físicas (viscosidade e tensão superficial) e permite a utilização de amostras líquidas e sólidas.

As interferências de *background* quando não corrigidas devidamente, podem alterar bastante a sensibilidade do método. A precisão, embora seja já

menor do que com chama, é melhorada quando se utiliza amostrador automático, o que implica aumentar os custos do método.

3.2.2. Espectrometria de Absorção atômica com geração de hidretos

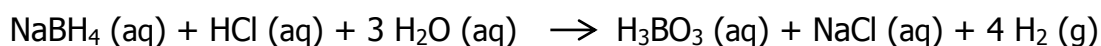
O método HGAAS baseia-se na formação, através de reacção de redução, de hidretos voláteis do elemento que se quer determinar. Após a geração de vapor químico, o analito é facilmente separado da matriz pela formação de compostos gasosos, resultantes de reacções químicas. Assim, este tipo de método aplica-se a elementos que formem hidretos voláteis, como o arsénio (As), bismuto (Bi), germânio (Ge), índio (In), Selénio (Se), entre outros.

3.2.2.1. Reacções de redução e processo de atomização

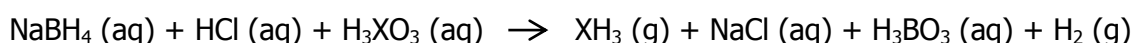
O processo de atomização em HGAAS envolve três etapas: a geração de hidretos, transferência dos compostos voláteis para o atomizador e decomposição dos hidretos para formação de átomos do elemento em estudo, no estado gasoso.

O principal agente redutor utilizado neste método analítico é o borohidreto de sódio (NaBH_4), já que apresenta vantagens em relação a outros potenciais agentes redutores, ou seja permite que a reacção seja rápida, eficaz e que se desenvolva em sistema homogéneo. Este composto pode ser aplicado na determinação de imensos elementos (Lajunen & Peramaki, 2004). Contudo, este composto apresenta um elevado grau de instabilidade em meio ácido, sendo necessária a adição de hidróxido de sódio (NaOH) numa concentração de $0,25\text{mol/L}$, de forma a manter a estabilidade reaccional do NaBH_4 (Knechtel & Fraser, 1978).

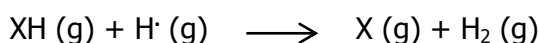
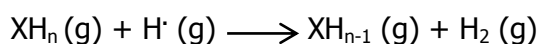
As equações químicas abaixo caracterizam a reacção que permite a formação do hidreto do elemento. Assim que se mistura a solução de NaBH₄ e a amostra em meio ácido, dá-se a oxidação do anião borohidreto a ácido bórico.



Os hidretos voláteis de elemento X (XH₃) são arrastados para a célula de quartzo com o auxílio de um corrente de gás inerte, o argón. A presença de hidrogénio em excesso facilita o transporte dos hidretos.



As reacções de libertação do elemento a detectar parecem ser complexas e ainda pouco conhecidas. Mas de forma geral sabe-se que a colisão do hidreto com radicais livres de hidrogénio permite a decomposição e libertação do elemento em estudo (Welz & Sperling, 1999).



3.2.2.2. Instrumentação

Para a realização do método de HGAAS foi utilizado um sistema contínuo, onde se adiciona amostra à solução de borohidreto, em adição ao ácido clorídrico que funciona também como solução de arraste. A figura 6 apresenta o sistema *Flow injection for atomic spectroscopy* (FIAS) 100 utilizado.

Figura 6 – Bloco de reacção FIAS 100 (adaptado de PerkinElmer)



A célula de quartzo encontra-se aquecida à temperatura de atomização do elemento em estudo, favorecendo a dissociação do hidreto gasoso em átomos do analito. A célula de quartzo favorece a detecção do analito, já que aumenta o tempo de resistência no percurso óptico, favorecendo a sensibilidade do método.

3.2.2.3. Interferências

3.2.2.3.1. Interferências químicas

A utilização de ácido clorídrico na preparação da amostra e como solução de arraste permite que haja uma diminuição nas interferências químicas, já a escolha de outros ácidos leva a alterações na eficácia do método. O ácido fluorídrico deve ser evaporado na totalidade antes da análise uma vez que interfere na quantificação de concentrações baixas. O ácido clorídrico e nítrico apenas diminui o sinal quando se trabalha com elevadas concentrações. A escolha de ácido clorídrico permite uma reacção rápida, homogénea e quantitativa, com o NaBH_4 (Lajunen & Peramaki, 2004).

3.2.2.3.2. Interferências cinéticas

A alteração da velocidade da formação e libertação dos hidretos em solução causa interferências cinéticas. A utilização da integração da área do pico, em alternativa à leitura da altura do pico permite eliminar as interferências de ordem cinética. O volume de solução pode influenciar a sensibilidade, já que os hidretos são libertados mais facilmente em volumes pequenos do que maiores volumes de amostra (Lajunen & Peramaki, 2004).

3.2.2.3.3. Interferências espectrais

As interferências espectrais neste método são quase nulas, já que há uma separação do hidreto do analito dos restantes componentes da matriz. Assim, na grande maioria dos casos, só é arrastado para o atomizador o hidreto formado, ficando no vaso de reacção os possíveis interferentes.

3.2.2.4. Vantagens e Desvantagens

Associadas ao método HGAAS estão aspectos vantajosos e alguns desvantajosos, quanto à sua utilização.

As vantagens que se podem associar a este método são: (1) permitir a separação do elemento em estudo da matriz; (2) as interferências da matriz são praticamente anuladas; e (3) os limites de detecção são muito baixos (ordem dos ppb).

As desvantagens que se relacionam à escolha da HGAAS são: (1) o número de elementos que gera hidretos é reduzido; (2) o método depende da estabilidade de vários factores, como o estado de oxidação do elemento, o tempo de reacção, a pressão do gás, a concentração do analito, o volume da solução e a temperatura da célula.

CAPÍTULO II - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1. MATERIAL E REAGENTES

1.1. Amostras

As amostras escolhidas para as análises dos metais foram adquiridas em hipermercados e lojas de produtos dietéticos. No total, foram analisadas vinte e três amostras, em que quinze são da planta *Camellia sinensis* e oito são de outras plantas (Flor de carqueja, Cavalinha, Eucalipto e Camomila). A tabela abaixo indica o código dado a cada amostra, planta, variedade e o tipo de produção (quinze amostras provenientes de agricultura tradicional e oito de biológica).

Tabela 2 – Dados sobre as amostras analisadas.

Variedade	Amostra	Planta	Tipo de Produção
Chá Preto	C	<i>Camellia sinensis</i>	Biológica
	K	<i>Camellia sinensis</i>	Tradicional
	I	<i>Camellia sinensis</i>	Tradicional
	M	<i>Camellia sinensis</i>	Tradicional
Chá Preto (<i>leaf</i>)	F	<i>Camellia sinensis</i>	Tradicional
Chá Preto (<i>pekoe</i>)	G	<i>Camellia sinensis</i>	Tradicional
Chá Verde	A	<i>Camellia sinensis</i>	Biológica
	B	<i>Camellia sinensis</i>	Biológica
	E	<i>Camellia sinensis</i>	Tradicional
	J	<i>Camellia sinensis</i>	Tradicional
	L	<i>Camellia sinensis</i>	Tradicional
Chá Branco	D	<i>Camellia sinensis</i>	Biológica

	H	<i>Camellia sinensis</i>	Tradicional
	N	<i>Camellia sinensis</i>	Tradicional
	O	<i>Camellia sinensis</i>	Tradicional
Flor de Carqueja	P	<i>Pterospartum tridentatum</i>	Biológico
Flor de Carqueja	T	<i>Pterospartum tridentatum</i>	Tradicional
Cavalinha	Q	<i>Equisetum arvense</i>	Biológico
Cavalinha	U	<i>Equisetum arvense</i>	Tradicional
Eucalipto	R	<i>Eucalyptus globulus</i>	Biológico
Eucalipto	S	<i>Eucalyptus globulus</i>	Tradicional
Camomila	V	<i>Matricaria recutita</i>	Biológico
Camomila	W	<i>Matricaria recutita</i>	Tradicional

1.2. Reagentes

A tabela 3 apresenta a listagem de reagentes e reúne a informação química de cada reagente e também o fornecedor/marca do mesmo.

Tabela 3 – Reagentes utilizados na análise de metais.

Reagente	Nome comercial	Marca/Fornecedor
Solução Padrão Chumbo	Lead atomic absorption standart solution	SIGMA
Solução Padrão Cádmio	Cadmium atomic absorption standart solution	SIGMA
Solução Padrão Níquel	Nickel standart	MERCK
Solução Padrão Alumínio	Aluminum atomic absorption standart solution	SIGMA
Solução Padrão Arsénio	Arsenic standart	MERCK
Solução Padrão Selénio	Selenium standart	MERCK
Ácido Nítrico 65%	-	MERCK
Ácido Nítrico 67%*	-	PROLABO
Peróxido de hidrogénio*	Hydrogen peroxide solution	Fluka

Material de Referência	-	National Research Council Canada (NRCC)
Modificador de Matriz*	Magnesium nitrate hexahydrate	MERCK
Iodeto de potássio	-	Panreac
Ácido ascórbico	-	MERCK
Borohidreto de sódio	-	MERCK
Hidróxido de sódio	-	MERCK
Ácido Clorídrico*	-	Panreac
Material Certificado de Referência	-	Environment Canada

* Reagentes, com elevado grau de pureza (Ultrapure), próprios para a determinação de espécies vestigiais de metais.

1.3. Material e instrumentação

Para evitar contaminações, todo o material (balões volumétricos, tubos de ensaio, pontas para micropipetas, copos e tubo de polipropileno) foi imerso em solução de 15% (v/v) de HNO_3 durante 24 horas. Depois deste tempo, o material foi lavado em água desionizada e seco numa zona protegida de pó, até ser utilizado. A água desionizada $18\text{M}\Omega\text{cm}$ utilizada em todas as análises foi obtida por um sistema Milli-Q da Millipore.

Na tabela 4 encontram-se as informações sobre os equipamentos utilizados no desenvolvimento prático do estudo.

Tabela 4 – Equipamentos utilizados.

Equipamento		Funcionalidade / Especificações	Modelo/Marca comercial
Espectrofotómetro AAnalyst 700, equipado com corrector de <i>background</i> de deutério	Módulo para câmara de grafite	Deteção e quantificação de concentrações de metais	AA 700 Perkin Elmer
	Módulo para geração de hidretos	Deteção e quantificação de concentrações de metais	FIAS 100 Perkin Elmer

Câmara da grafite com plataforma L'vov		Local de introdução de amostras usado no método GFAAS	AA 700 Perkin Elmer
Pipetador automático	Módulo para câmara de grafite	Pipetagem e diluição de amostras, padrões e modificadores de matriz	AS 800, Perkin Elmer
Lâmpadas	Alumínio	$\lambda=309, \text{nm}$; $I=25 \text{mA}$	Pye Unicam Hollom Cathode Lamp
	Arsénio	$\lambda=193,7 \text{nm}$; $I=380 \text{mA}$	Light-Emitting Diode (LED) Sys 2 – Perkin Elmer
	Cádmio	$\lambda=228,8 \text{nm}$; $I=5 \text{mA}$	Pye Unicam Hollom Cathode Lamp
	Chumbo	$\lambda=283,3 \text{nm}$; $I=12 \text{mA}$	Cathode Lamp – Perkin Elmer
	Cobre	$\lambda=324,8 \text{nm}$; $I=5 \text{mA}$	Cathode Lamp – Perkin Elmer
	Crómio	$\lambda=357,9 \text{nm}$; $I=25 \text{mA}$	Cathode Lamp – Perkin Elmer
	Selénio	$\lambda=196,0 \text{nm}$; $I=290 \text{mA}$	LED Sys 2 – Perkin Elmer
Balança		Pesagem de amostras	AB 204, Mettler Toledo
Banho termoestático		Aquecimento para digestão de amostras e preparação de brancos	Grant W6
Sistema de purificação de água		Produção de água desionizada	Direct-Q UV3, Millipore - Bedford
Mufla		Digestão de amostras	Carbolite

2. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

De um modo geral, as amostras analisadas por absorção atômica são submetidas previamente a um tratamento. Há vários métodos de tratamento das amostras mas, na grande maioria, é utilizada digestão ácida e/ou o uso de temperaturas elevadas de modo a destruir a matéria orgânica.

A inceneração consiste em submeter a amostra a elevadas temperaturas, numa mufla. A temperatura de inceneração deve ser inferior à temperatura de volatilização dos elementos que se pretende analisar. Após mineralização, as amostras são dissolvidas em ácido e diluídas.

A digestão ácida baseia-se na adição de ácido fortes e oxidantes às amostras. Após adição dos ácidos as misturas são aquecidas até ebulição e dissolução das amostras.

Outro processo presentemente muito utilizado centra-se na digestão ácida e microondas em recipientes fechados. Este método tem como vantagem em relação aos anteriores o facto de ser uma digestão mais rápida e apresenta menos perdas. A maior desvantagem resulta de apenas se poderem digerir quantidades muito pequenas de amostra, o que em muitos casos é uma limitação.

Com o objectivo de otimizar o processo de preparação das amostras de chá, testaram-se vários métodos de digestão e que são descritos resumidamente em baixo. Finalmente é descrito o método seleccionado para digerir todas as amostras.

2.1. Métodos de digestão testados

1º Método de digestão

Segundo Gomez, Cerutti, Sombra, Silva, & Martínez, 2007, o estudo de metais em amostras de chá, deve ser iniciado com uma digestão ácida das

amostras. A matéria orgânica foi destruída usando uma mistura de HNO_3 , HClO_4 e ácido fluorídrico (HF). A 2 g de cada amostra são adicionados 10 mL de HNO_3 . A solução deve ser evaporada. Ao resíduo obtido é adicionado HClO_4 . Posteriormente, o HF é adicionado, até libertação de fumos brancos. Os resíduos são diluídos em 50 mL de água desionizada e devidamente filtrados. As partículas que não se solubilizaram, restantes da filtração, são tratadas com 5 mL de HNO_3 e diluídos em 50 mL de água desionizada, em balões volumétricos de plástico (Gomez et al., 2007).

2º Método de digestão

O estudo indica que 0,50 g de amostra devem ser colocados numa proveta de 100 mL. De seguida adicionam-se 10 mL de HNO_3 aos 0,50g, devidamente aquecidos no banho termostatado. A digestão completa dura cerca de uma hora. 1 mL de HClO_4 a 70% (V/V) é adicionado e mantém-se o aquecimento por mais uma hora. No decorrer da digestão devem-se adicionar pequenas alíquotas de água desionizada para evitar a evaporação total. Após o arrefecimento da solução, esta é filtrada e transferida para um balão volumétrico de 100 mL. O balão é completado com água desionizada (Ashraf & Mian, 2008).

3º Método de digestão

Para o doseamento de minerais tóxicos e essenciais em folhas de chá preto é descrita uma prévia preparação das amostras que consiste na digestão ácida da matéria orgânica. Numa proveta de vidro é colocado 1g de amostra e adicionado 5 mL de HNO_3 . A solução é mantida durante a noite, à temperatura ambiente. A amostra é aquecida numa placa (80°C, 30 min), após o arrefecimento adiciona-se uma mistura de 1 mL de HNO_3 e 4 mL de HClO_4 . A digestão é favorecida pelo aquecimento a 130°C, durante uma hora, até se

obter uma solução transparente. As soluções são filtradas e colocadas em balões volumétricos de 25 mL e perfeitos com água desionizada (Salahinejad & Aflaki, 2010).

4º Método de digestão

Na determinação de chumbo em folhas de chá descreve-se a digestão da matéria orgânica, começando por pesar 0,5 g de amostra. As folhas de chá são digeridas com 4 mL de água-régia (ácido clorídrico (HCl):HClO₄ 4:1 V/V), a 130°C, até se obter uma solução transparente. As amostras são diluídas em água desionizada (Jin *et al.*, 2005).

5º Método de digestão

Soykak, M., *et al.*, realizaram um estudo comparativo entre os vários métodos de digestão para a determinação de metais pesados em especiarias. Um dos procedimentos de digestão “*wet ashing*” implica a utilização de uma mistura (HNO₃:H₂O₂ 2:1), em que 12 mL são adicionados a 1 g de amostra, numa proveta de 100 mL, dentro da *hote*. A mistura é aquecida a 130°C durante quatro horas. A solução é colocada num balão volumétrico de 25 mL e completado com água desionizada (Soylak *et al.*, 2004).

6º Método de digestão

Noutro estudo de Soykak, M., *et al.*, também foi utilizado um procedimento de digestão “*dry ashing*”, que consiste em colocar 1g de amostra num cadinho de porcelana. A amostra é exposta ao aumento progressivo da temperatura (450°C), numa mufla, durante uma hora. Durante oito horas a temperatura é mantida, até se obter cinzas brancas ou cinzentas. O resíduo é

dissolvido em 5 mL de HNO_3 (25%, V/V) e caso seja necessário a solução deve ser aquecida, lentamente, até a dissolução total. A solução é transferida para um balão volumétrico de 25 mL e preenchido o seu volume com água desionizada (Soylak *et al.*, 2004).

2.2. Método de digestão utilizado

Os resultados obtidos do tratamento de amostras pelos métodos anteriormente descritos não foram os desejados. Foram detectadas perdas de amostra causada pela forte ebulição na adição dos ácidos fortes e além disso as soluções finais obtidas, mesmo após filtração não eram suficientemente transparentes, como é requerido para a análise por espectrometria.

O método usado para a digestão da matéria orgânica das amostras previamente moídas, foi inceneração na mufla seguida da adição de HNO_3 e H_2O_2 . A amostra foi colocada em cadinhos de porcelana e exposta ao aumento progressivo da temperatura, até aos 450°C. A escolha desta temperatura foi feita ressaltando os valores de temperatura de volatilização de cada metal, de forma a não haver perdas de analito no tratamento. A temperatura foi mantida durante doze horas. No fim obtiveram-se cinzas brancas ou cinzentas. Na *hote*, foi adicionado ao resíduo 1 mL de HNO_3 a 27% (V/V). A solução foi submetida à temperatura de 80°C, na placa de aquecimento, durante uma hora. Para se obter uma solução totalmente límpida foi adicionado 1 mL de H_2O_2 à mistura, e aguardou-se até se visualizar uma solução totalmente transparente. A solução foi filtrada para um balão volumétrico de 15 mL e o seu volume foi completado com água desionizada (Aras & Ataman, 2006).

3. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Qualquer método analítico é susceptível ao surgimento de erros, quer aleatórios, quer sistemáticos. A validação de método é tão necessária quanto o rigor exigido nos resultados a apresentar. A validação, como um conjunto de procedimentos analíticos, permite que sejam determinadas características analíticas do estudo. O objectivo da Validação é uniformizar os critérios utilizados para demonstrar que um método, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida.

Para a validação de métodos internos de ensaio os requisitos mínimos dependem do tipo de método a validar e compreendem o estudo e conhecimento dos seguintes parâmetros: gama de trabalho, linearidade, limiares analíticos, sensibilidade, precisão e exactidão.

A escolha dos parâmetros a estudar recai sobre o facto do método em estudo ser quantitativo, com gamas de concentrações baixas. Assim, serão analisados os seguintes parâmetros: gama de trabalho, linearidade, limiares de detecção e quantificação, precisão e exactidão. Contudo, são apresentados requisitos mínimos que devem ser tidos em conta, como a gama de trabalho/linearidade, limiares analíticos, sensibilidade, precisão e exactidão.

O processo de validação deve ser realizado seguindo manuais ou guias credíveis, onde são dadas as indicações para o desenvolvimento da validação do método. No presente trabalho a validação do método foi realizada seguindo as indicações da Relacre no Guia 13 – Validação de métodos internos de ensaio em análise química, Fevereiro 2000 e especificamente para o estudo da curva de calibração e regressão linear foi estudada a Norma ISSO 8466-1, de Maio de 2011.

3.1. Validação indirecta

A validação, por avaliação indirecta, é efectuada por determinação e evidência dos parâmetros característicos.

3.1.1. Especificidade/Selectividade

A selectividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular, numa matriz complexa sem a interferência dos outros componentes. Um método diz-se específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias, presentes na amostra, ou seja, quando garante que a grandeza medida provém apenas do analito. Para este estudo é utilizado uma amostra complexa, de forma a averiguar a possível interferência de outras substâncias.

Para avaliar as interferências da matriz, realiza-se o teste de recuperação, utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas se faz variar a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho.

Um método analítico pode ser considerado aplicável (específico e selectivo) quando se verificar que as taxas de recuperação são próximas de 100%.

3.1.2. Linearidade das curvas de calibração

Em análises quantitativas, a calibração indica um processo pelo qual a resposta dada pelo sistema de medida está relacionada com uma concentração ou quantidade de substância conhecida (padrões). A calibração implica a preparação de uma série de soluções padrão em que a concentração do analito a dosear é conhecida. A medição destas soluções deve ser feita nas mesmas condições de leitura das amostras, de forma a criar um gráfico de calibração,

determinando-se posteriormente, a concentração do analito na amostra, por interpolação.

Os padrões usados devem distribuir-se equitativamente pela gama de trabalho e o branco de calibração (solução com todos os reagentes, excepto o analito), que habitualmente é diferente de zero, deverá ser incluído na recta de calibração (se for aplicável).

A utilização do método dos mínimos quadrados implica a construção de um gráfico, onde o eixo vertical representa a resposta instrumental ou sinal do equipamento e o eixo horizontal representa as concentrações dos padrões.

Caso a curva de calibração represente um função polinomial de primeiro grau (um recta) e se utilize o método dos mínimos quadrados para a regressão linear, pressupõe-se que os erros têm uma distribuição normal, existindo também homogeneidade de variâncias ao longo da recta.

A recta de calibração é formada por um conjunto de pares ordenados e independentes (X_N , Y_N) que deverá corresponder a N pontos marcados na recta.

O cálculo do coeficiente de correlação (ρ) é usado como um dos parâmetros para avaliar a calibração analítica. O valor do coeficiente pode tomar valores entre -1 e 1, em que o valor $\rho=-1$ representa uma correlação negativa e o valor $\rho=1$ representa uma correlação positiva.

3.1.3. Limiares analíticos

3.1.3.1. Limite de detecção

O limite de detecção é o valor medido a partir do qual é possível detectar a presença do analito, com uma certeza estatística razoável. Este limiar corresponde então à mais pequena quantidade de substância que pode ser detectada numa amostra, sendo quantificada ou não como valor correcto.

Assim, numa leitura inferior ao limite de detecção não significa a ausência do analito, mas sim que a concentração do analito a quantificar é inferior a limite de detecção.

Quantitativamente, o limite de detecção corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco (amostra que contém a mesma matriz, mas não contém o analito).

Na definição de limite de detecção está inerente a introdução de dois termos estatísticos: erro do tipo I e erro do tipo II; em que o erro do tipo I (risco α) é a probabilidade de concluir pela presença do analito quando de facto o analito não existe na amostra e o erro do tipo II (risco β) é a probabilidade de concluir pela ausência do analito quando ele de facto existe na amostra.

Em termos quantitativos o limite de detecção é obtido por:

$$LD = X_0 + K \cdot \sigma_0$$

Em que:

- X_0 é média aritmética do teor medido de uma série de brancos.
- σ_0 representa o desvio padrão associado a X_0 .

Se a lei de probabilidade de X_0 for gausseana (distribuição normal de erros) K toma o valor 3.3, para um nível de confiança de 99.7%.

Também é possível determinar o limite de detecção através da calibração linear:

$$LD = [3.3 \cdot S_{y/x}] / b$$

Em que:

- $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração.
- b é o declive do mesmo.

3.1.3.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com exactidão e precisão conhecidas. Este limite deverá corresponder ao padrão de concentração menor, na recta de calibração.

O coeficiente de variação para este valor não deverá exceder 10%.

Quantitativamente, o limite de quantificação é determinado por:

$$LQ = X_0 + 10 \cdot \sigma_0$$

Em que:

- X_0 é média aritmética do teor medido de uma série de brancos.
- σ_0 representa o desvio padrão associado a X_0 .

Para determinar o limite de quantificação, através de uma curva de calibração linear, usa-se a seguinte fórmula:

$$LQ = [10 \cdot S_{y/x}] / b$$

Em que:

- $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração.
- b é o declive do mesmo.

A identificação e quantificação deste limite deverá ser feita de forma clara e precisa, já que é um valor usado frequentemente nas apresentações de resultados.

3.1.4. Gama de trabalho

A gama de trabalho deve ser definida sempre que a metodologia de ensaio implica o traçado de uma curva de calibração. A gama de trabalho é avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias.

O número mínimo de pontos na curva de calibração é cinco, e deverão distribuir-se de igual modo na gama de concentrações. O primeiro e o último padrão da curva são analisados em dez réplicas independentes.

O teste de homogeneidade de variâncias permite testar se existem diferenças estatisticamente significativas, comparando as variâncias associadas ao primeiro e último padrão.

Após ser conhecido o valor das variâncias, estas são comparadas efectuando o cálculo do valor teste PG:

$$a) PG = S^2_{10} / S^2_1$$

$$b) PG = S^2_1 / S^2_{10}$$

Sendo:

$$a) \text{ quando } S^2_{10} > S^2_1$$

$$b) \text{ quando } S^2_1 > S^2_{10}$$

O valor de PG é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor / Fisher, para $n-1$ graus de liberdade; e se o valor PG for inferior ou igual ao tabelado as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho é ajustada ao método; se o valor de PG for superior ao valor tabelado as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias permitam obter valores de PG inferiores ao valor tabelado.

3.1.5. Precisão

A precisão é um termo estatístico que avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.

O estudo da precisão engloba duas medidas extremas, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade. Também se efectuam estudos de precisão intermédia.

3.1.5.1. Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método efectuado em condições idênticas, ou seja, em ensaios efectuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível.

O limite de repetibilidade (r) é o valor abaixo do qual se deve situar a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio (X_i , X_{i-1}). Na prática, os valores aceites devem respeitar a seguinte inequação:

$$|X_i - X_{i-1}| \leq r$$

A repetibilidade é determinada efectuando uma série de repetições sobre uma amostra ou padrões.

3.1.5.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia é uma forma de avaliar, sobre a mesma amostra ou padrão, usando o mesmo método, mas definindo exactamente as condições a variar (por exemplo o dia). Esta medida é considerada como a mais representativa da variabilidade dos resultados.

Para esta avaliação efectua-se um número de repetições, na amostra pré-definida para o estudo. A precisão intermédia é baseada na dispersão entre ensaios.

De forma simplificada, para estimar a precisão intermédia baseia-se em efectuar dez ou mais medições sobre a mesma amostra ou padrão, em condições pré-definidas.

A estimativa da precisão intermédia $S_{i(d)}$ é dada por:

$$S_{i(d)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}$$

Em que $S_{i(d)}$ é o desvio padrão de precisão intermédia relativo a um dia específico.

Sendo:

n – número de padrões;

Y_k – resultado individual;

\bar{y}

- média aritmética dos resultados individuais.

3.3. Validação directa – Exactidão

A validação directa visa essencialmente determinar a exactidão do método de ensaio. A exactidão é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro.

A utilização de Materiais de Referência Certificados (MRC) é uma das possíveis formas de determinar a exactidão do método. O MRC possui um valor de concentração ou grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada. No presente trabalho foi utilizado o MRC TM-24.3 (lote 0510) (Anexo I).

Para a avaliação dos resultados obtidos podem ser efectuados os seguintes cálculos:

- Erro relativo;
- Teste de hipóteses T;
- Factor de desempenho Z;
- Erro normalizado.

O Erro relativo (Er) exprime a componente de erros sistemáticos e um valor para Er inferior ou igual a 5% é satisfatório. Er é expresso em percentagem e é obtido pela expressão:

$$Er = [(X_{lab} - X_v) / X_v] \cdot 100$$

Em que:

X_{lab} – valor obtido experimentalmente (ou média de valores);

X_v – valor aceite como verdadeiro.

O Teste de hipóteses T averigua também a existência de erros sistemáticos associados ao método. Este teste efectua-se calculando o valor t :

$$t = [(X_{lab} - X_v) \cdot \sqrt{N}] / S_{X_{lab}}$$

Sendo:

X_{lab} – média de valores obtidos experimentalmente;

X_v – valor aceite como verdadeiro;

N – número de repetições;

$S_{X_{lab}}$ – desvio padrão associado à média X_{lab} .

O módulo do valor t é comparado com o valor t_{tab} (valor tabelado para determinados grau de confiança e N-1 graus de liberdade), tomando-se como critério:

- Se $|t| \leq t_{tab}$, não ficou estatisticamente evidenciada a existência de erros sistemáticos e logo o ensaio é satisfatório;

- Se $|t| > t_{tab}$, ficou estatisticamente evidenciada a existência de erros sistemáticos e logo o ensaio não é satisfatório.

Outra forma de avaliar o desempenho do método na análise de um MRC é calculando o factor de desempenho Z , através da fórmula:

$$Z = (X_{lab} - X_v) / S$$

Sendo:

X_{lab} – valor obtido experimentalmente;

X_v – valor aceite como verdadeiro;

S – unidade de desvio, que pode ser a incerteza do MRC.

A avaliação é feita segundo a escala de pontuação:

$|Z| \leq 2$ – Satisfatório;

$2 < |Z| \leq 3$ – Questionável;

$|Z| > 3$ – Incorrecto.

Quando é calculada a incerteza do resultado (U_{lab}), o valor verdadeiro (X_v) deve estar dentro do intervalo de incerteza do X_{lab} . O Erro normalizado (En) é calculado segundo a fórmula:

$$En = (X_{lab} - X_v) / (\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2})$$

Sendo:

U_{ref} – incerteza associada ao valor verdadeiro.

Se $|En| \leq 1$ então U_{lab} está bem estimada.

4. ANÁLISE QUANTITATIVA DE METAIS

4.1. Análise quantitativa de metais por GFAAS

Para a análise dos vários metais por GFAAS foram otimizados os parâmetros: temperatura, tempo e fluxo de argon para cada um dos metais. As tabelas abaixo apresentam os programas utilizados para cada um dos cinco metais quantificados por este método.

Tabela 5 – Programa para a determinação do alumínio.

Passo	Temperatura (°C)	Tempo de subida	Tempo de espera	Fluxo de gás
1	100	5	20	250
2	140	15	35	250
3	700	10	20	250
4	2500	0	3	0
5	2600	3	5	250

Tabela 6 – Programa para a determinação do cádmio.

Passo	Temperatura (°C)	Tempo de subida	Tempo de espera	Fluxo de gás
1	100	5	20	250
2	140	15	35	250
3	700	10	20	250
4	1500	2	8	0
5	2650	5	5	250

Tabela 7 – Programa para a determinação do chumbo.

Passo	Temperatura (°C)	Tempo de subida	Tempo de espera	Fluxo de gás
1	100	5	20	250
2	140	15	35	250
3	700	10	20	250
4	1900	0	3	0
5	2650	3	4	250

Tabela 8 – Programa para a determinação do cobre.

Passo	Temperatura (°C)	Tempo de subida	Tempo de espera	Fluxo de gás
1	100	5	20	250
2	140	15	35	250
3	1000	10	20	250
4	2300	0	5	0
5	2600	1	3	250

Tabela 9 – Programa para a determinação do crómio.

Passo	Temperatura (°C)	Tempo de subida	Tempo de espera	Fluxo de gás
1	100	5	20	250
2	140	15	15	250
3	1650	10	20	250
4	2500	0	5	0
5	2600	1	3	250

4.2. Análise quantitativa de metais por HGAAS

Para a utilização do método de HGAAS, as amostras e padrões tiveram de, previamente, sofrer uma reacção de redução do metal em questão.

Para a redução de arsénio VI a arsénio III, a cada 1 mL de amostra ou padrão foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico concentrado, 1 mL de KI 5% (v/v) e 1 mL de ácido ascórbico 5% (v/v), num balão de 10 mL completado com água desionizada. Após 45 minutos de tempo de espera à temperatura ambiente, as amostras e padrões são pipetados (500 µL) e adicionados à solução de NaBH₄ 0,2% (v/v) e NaOH 0,05% (v/v), no vaso de reacção. A célula deve estar à temperatura de 900°C.

A redução do selénio é realizada através da adição de HCl à amostra ou padrão numa relação de 1:1. A solução é aquecida a 90°C durante 20 minutos. Após este passo a solução pode ser utilizada para quantificação do elemento em questão. A solução de NaBH₄ 0,2% (v/v) e NaOH 0,05% (v/v) é também utilizada e misturada à amostra ou padrão, na reacção de formação do hidreto.

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

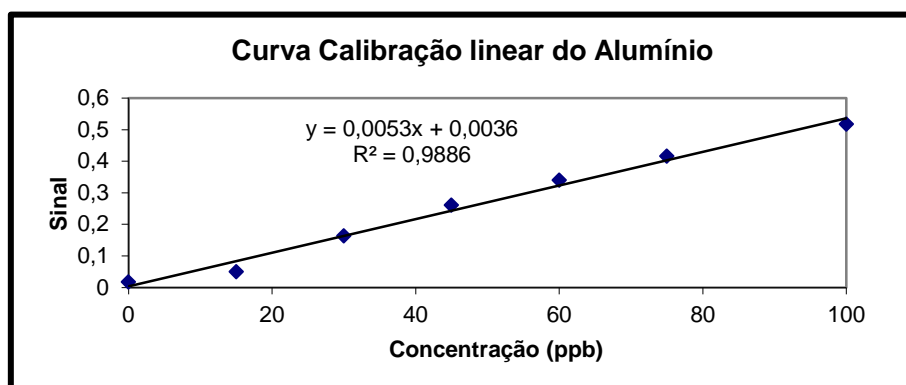
1. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

1.1. Validação dos métodos analisados por GFAAS

1.1.1. Alumínio

O passo inicial da validação de métodos é a determinação de uma curva de calibração. O gráfico 1 abaixo representa a curva de calibração que foi utilizada quer para a validação de método quer para a interpolação das concentrações de metais nas amostras.

Gráfico 1 – Curva de calibração do alumínio.



Os estudos de linearidade baseiam-se na determinação de diversos valores estatísticos, apresentados na tabela 10. O ajuste linear da curva é revelado pela percentagem de p (R^2). Também através do valor teste PG, que compara as duas equações das curvas determinadas, que foi inferior ao valor tabelado da distribuição de F de Snedecor/Fisher, se pode afirmar a linearidade do método utilizado para o chumbo. (ver anexo II e III)

Tabela 10 – Equações das curvas de calibração linear e não linear e respectivos dados estatísticos para a avaliação da linearidade do método utilizado para o alumínio.

Equação da função linear	$y = 0,0053x + 0,0036$
Declive	0,0053
Ordenada na origem	0,0036
R^2	0,9886
Desvio padrão residual da função linear	0,135
Equação da função não linear	$y = -8E-06x^2 + 0,0061x - 0,0071$
Desvio padrão residual da função não linear	0,189
Diferença de variâncias (DS^2)	-0,029
Valor teste - PG	0,024
Valor tabelado da distribuição F para 95% de confiança	5,05
Valor tabelado da distribuição F para 99% de confiança	10,97

A gama de trabalho de um método deve estar correctamente ajustada ao estudo a que é aplicada. O ajuste da gama de trabalho é feito usando os padrões da curva de calibração, os de menor e de maior concentração, aplicando o teste de homogeneidade de variâncias. A gama de trabalho foi testada através da leitura dos padrões de concentração menor e maior, ou seja, 15 µg/L e 100 µg/L. Os resultados obtidos estão representados na tabela 11.

Tabela 11 – Resultados das repetições (n=10) dos padrões de 15 µg/L e 100 µg/L, para o alumínio.

Dados	15 µg/L	100 µg/L
Média (µg/L)	10,914	92,79
Desvio padrão	0,743	1,309
Variância	0,551	1,713
Desvio padrão residual (RSD) (%)	6,807	1,411

Da comparação das variâncias dos dois padrões obteve-se o valor PG de 3,104. Para um intervalo de confiança de 95% o valor F é 3,18 que é superior ao valor PG. Conclui-se assim que não existem diferenças estatisticamente significativas nas variâncias dos padrões estudados, podendo-se afirmar que a gama de trabalho está devidamente ajustada.

Para a determinação dos limites analíticos foram tidas em conta repetições de brancos, de onde se retiram os seguintes dados, representados na tabela 12.

Tabela 12 – Resultados das repetições (n=10) de brancos, para o alumínio.

Média (µg/L)	1,723
Desvio padrão	0,473
LD	3,282
LQ	6,449

Os ensaios de precisão intermédia foram realizados em três dias diferentes, não consecutivos. O padrão de 60 µg/L foi utilizado para a leitura das repetições (n=10). A tabela 13 apresenta estes resultados.

Tabela 13 – Valor do desvio padrão residual (%), para o alumínio, referentes ao estudo de precisão intermédia (n=30).

	Valor esperado (µg/L)	Valor médio obtido (µg/L)	RSD (%)
Alumínio	60	60,32	2,145

Os ensaios de repetibilidade consistem na leitura (n=10) de três padrões de concentrações diferentes, dispersos na curva de calibração. No caso do alumínio foram usados os padrões de 15, 60 e 100 µg/L. Na tabela 14 apresentam-se os resultados obtidos, em que o objectivo é obter uma percentagem de RSD inferior a 5%, de forma a ser provada a repetibilidade do método.

Tabela 14 – Valores do desvio padrão residual (%), para o alumínio, referentes ao estudo de repetibilidade.

	15 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
RSD	9,688	3,292	1,501

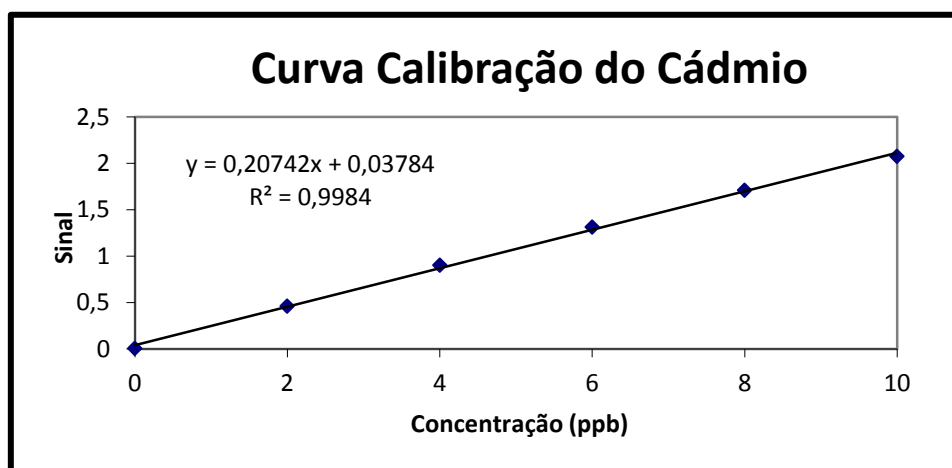
O valor obtido de RSD para o padrão de 15 µg/L foi superior ao esperado, mas sendo o primeiro padrão da curva e os outros dois padrões terem tido valores satisfatórios, decidiu-se aceitar estes resultados para a repetibilidade do método.

A exactidão foi testada utilizando uma solução certificada. A leitura (n=10) permite o cálculo do erro total, em percentagem. Este erro deverá ser inferior a 5%. A percentagem de erro apresentada para o alumínio foi 4,574.

1.1.2. Cádmio

O gráfico 2, abaixo, representa a curva de calibração utilizada na validação do método do cádmio e também foi utilizada para a interpolação da concentração do metal nas amostras estudadas. Cada ponto da curva é referente à média de três leituras sobre o mesmo padrão.

Gráfico 2 – Curva de calibração do cádmio.



O estudo de linearidade e a recolha de valores característicos torna-se essencial. A tabela 15 apresenta os parâmetros alcançados. O valor R^2 indica o ajuste linear da curva. Já o valor PG, que utiliza dados das duas curvas, linear e não linear, foi inferior ao valor tabelado da distribuição de F. Assim, conclui-se que o método é linear, para a determinação de cádmio.

Tabela 15 – Equações das curvas de calibração linear e não linear e respectivos dados estatísticos para a avaliação da linearidade do método utilizado para o cádmio

Equação da função linear	$y = 0,20742x + 0,03784$
Declive	0,207
Ordenada na origem	0,0378
R^2	0,998
Desvio padrão residual da função linear	0,377
Equação da função não linear	$y = -0,0028x^2 + 0,2354x + 0,002$
Desvio padrão residual da função não linear	0,268
DS^2	0,597
Valor teste - PG	0,597
Valor tabelado da distribuição F para 95% de confiança	6,39
Valor tabelado da distribuição F para 99% de confiança	15,98

Para testar o ajustamento da gama de trabalho realizou-se a leitura de padrões de menor e maior concentração, neste caso o de 2 e 10 µg/L. Desta leitura retiraram-se dados importantes, que são usados na comparação das variâncias. A tabela 16 apresenta os valores obtidos para os referidos padrões.

Tabela 16 – Resultados das repetições (n=10) dos padrões de 2 µg/L e 10 µg/L, para o cádmio.

Dados	2 µg/L	10 µg/L
Média (µg/L)	2,07	9,634
Desvio padrão	0,311	0,067
Variância	0,096	0,004
RSD (%)	2,784	0,692

Os valores de variância dos dois padrões dão origem ao valor PG que é comparado com o valor tabelado da distribuição F, para um intervalo de confiança de 5%. O valor PG obtido foi 0,0461, é inferior ao valor tabelado F (3,18). Assim sendo, pode-se afirmar que a gama de trabalho está devidamente ajustada, visto não se terem verificado diferenças estatisticamente significativas nas variâncias de cada padrão.

Os limites analíticos podem ser determinados utilizando a leitura (n=10) de brancos. A tabela 17 apresenta os valores obtidos para cada limite.

Tabela 17 – Resultados obtidos das repetições (n=10) de brancos, para o cádmio.

Média (µg/L)	0,027
Desvio padrão	0,006
LD	0,048
LQ	0,092

No estudo de precisão intermédia foi utilizado o padrão de 6 µg/L, lido (n=10) em três dias diferentes, não consecutivos, sendo . A tabela 18 indica os resultados obtidos para o cádmio.

Tabela 18 – Valor de desvio padrão residual (%), para o cádmio, referente ao estudo de precisão intermédia (n=30).

	Valor esperado (µg/L)	Valor médio obtido (µg/L)	RSD (%)
Cádmio	6	6,016	4,623

Os ensaios de repetibilidade consistiram na leitura de três padrões independentes, utilizados para a determinação da curva de calibração. No caso do cádmio foram utilizados os padrões de 2, 6 e 10 µg/L. Da leitura (n=10) é obtido para cada padrão um valor percentual de RSD. A tabela 19 apresenta os resultados obtidos e representativos da repetibilidade do método.

Tabela 19 – Valores de desvio padrão residual (%), para o cádmio, referentes ao estudo de repetibilidade.

	2 µg/L	6 µg/L	10 µg/L
RSD	4,216	1,782	0,723

A exactidão do método foi determinada através da utilização de uma solução devidamente certificada. A leitura (n=10) desta solução permite

determinar um valor médio da concentração do metal, que em comparação com o valor indicado pela casa comercial da solução certificada origina um valor de erro, em percentagem. O valor de erro obtido para o cádmio foi 5,313.

A especificidade/selectividade do método foi testada através da leitura de todas amostras fortificadas, com uma solução de concentração conhecida (5 µg/L). A tabela 20 apresenta os resultados obtidos para o cádmio. Como se vê os valores fazem parte do intervalo estabelecido, afirmando-se que o método é específico para a determinação do cádmio.

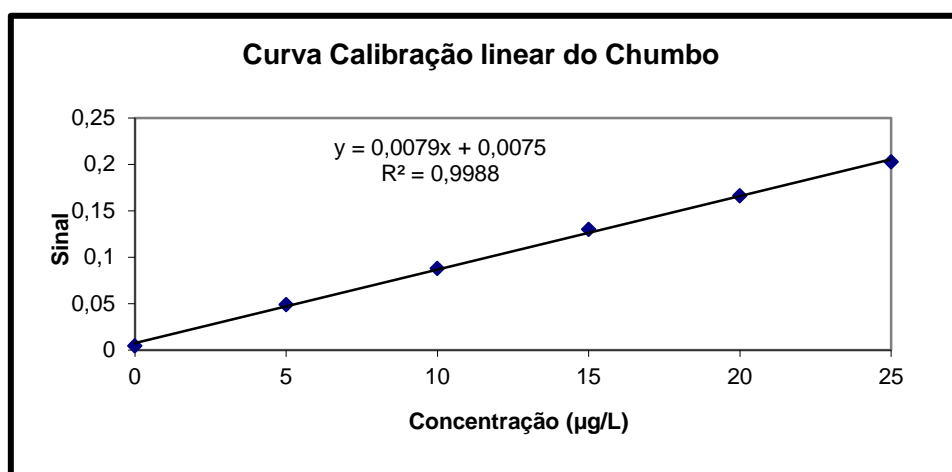
Tabela 20 – Teste de recuperação (%) de adição padrão em todas as amostras para o cádmio (os resultados são referentes ao valor médio n=3).

Amostra	Concentração da amostra (µg/L)	Padrão recuperado (µg/L)	Taxa de recuperação %
A	1,833	6,406	92
B	1,454	7,028	111
C	1,444	7,292	117
D	1,851	6,196	87
E	1,992	7,588	112
F	1,943	6,44	90
G	2,887	8,158	105
H	2,527	7,824	106
I	1,076	6,882	116
J	0,739	5,472	95
K	0,850	6,93	122
L	3,051	9,096	121
M	2,322	7,996	113
N	0,852	6,33	110
O	1,116	6,024	98
P	5,182	9,818	93
Q	0,260	5,52	105
R	0,483	5,286	96
S	1,116	5,482	87
T	0,551	5,922	107
U	0,674	6,194	110
V	3,786	8,896	102
W	6,353	11,298	99

1.1.3. Chumbo

O gráfico 3 representa a curva de calibração linear utilizada para a validação do método do doseamento do chumbo e também para a determinação da concentração do metal nas amostras. Os valores obtidos em cada ponto são referentes à média de três leituras sobre o mesmo padrão.

Gráfico 3 – Curva de calibração para o Chumbo.



O estudo estatístico da curva de calibração do método permite obter valores essenciais para a discussão da linearidade da recta. A tabela 21 resume esses mesmos parâmetros estatísticos. O valor R^2 obtido revela o ajuste linear da curva. Ainda através do valor teste PG, que considera as equações das curvas linear e não linear, e sendo inferior ao valor tabelado da distribuição de F de Snedecor/Fisher, pode-se afirmar que o método é linear.

Tabela 21 – Equações das curvas de calibração linear e não linear e respectivos dados estatísticos para a avaliação da linearidade do método utilizado para o chumbo.

Equação da função linear	0,0079x + 0,0075
Declive	0,0079
Ordenada na origem	0,0075
R^2	0,999
Desvio padrão residual da função linear	0,118
Equação da função não linear	$y = -4E-05x^2 + 0,0088x + 0,0046$
Desvio padrão residual da função não linear	0,123

DS ²	0,109
Valor teste - PG	0,789
Valor tabelado da distribuição F para 95% de confiança	0,789 < 6,39
Valor tabelado da distribuição F para 99% de confiança	0,789 < 15,98

No caso do chumbo os padrões utilizados foram o de 5 µg/L e o de 25 µg/L para o teste de ajuste da gama de trabalho. A tabela 22 representa os valores obtidos da leitura de cada padrão.

Tabela 22 – Resultados das repetições (n=10) dos padrões de 5 µg/L e 25 µg/L de chumbo.

Dados	5 µg/L	25 µg/L
Média (µg/L)	4,645	25,301
Desvio padrão	0,247	0,132
Variância	0,061	0,018
RSD (%)	5,320	0,523

Os valores obtidos para a variância de cada padrão são relacionados e originam um valor PG. Este mesmo valor, neste caso 0,287, é comparado com o valor tabelado da distribuição F, para um intervalo de confiança de 95%. O valor tabelado F é 3,18, que sendo superior ao valor PG obtido, pode-se garantir que a gama de trabalho está ajustada ao método, já que as diferenças nas variâncias não são estatisticamente significativas.

Os limites analíticos foram determinados através da leitura de repetições de brancos. A tabela 23 apresenta os resultados obtidos para o limite de detecção e quantificação.

Tabela 23 – Resultados obtidos da leitura de brancos (n=10), para o chumbo.

Média (µg/L)	4,885
Desvio padrão	0,075
LD (µg/L)	5,134
LQ (µg/L)	5,638

Os estudos de precisão intermédia consistiram na determinação do valor percentual de RSD, através da leitura ($n=10$) do padrão de $10 \mu\text{g/L}$, em três dias diferentes, não consecutivos. A tabela 24 indica os valores obtidos para este estudo.

Tabela 24 – Valor de desvio padrão residual (%), referente ao estudo de precisão intermédia do chumbo ($n=30$).

	Valor esperado ($\mu\text{g/L}$)	Valor médio obtido ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
Chumbo	10	9,643	3,291

Os ensaios de repetibilidade foram realizados através da leitura ($n=10$) de três padrões com concentrações dispersas pela curva de calibração. O valor percentual de RSD é calculado e representativo da repetibilidade do método. A tabela 25 mostra os resultados alcançados.

Tabela 25 – Valores de desvio padrão residual (%) referentes ao estudo de repetibilidade do chumbo.

	5 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$
RSD	6,015	4,478	2,851

O estudo da exactidão do método é feito através da utilização do MRC; da leitura do mesmo ($n=10$) é possível determinar um valor médio de concentração do metal e posteriormente calculado o erro total. O valor de erro obtido para o chumbo foi 0,943%.

A especificidade/selectividade do método foi testada através do teste de recuperação. Para o chumbo foi utilizado uma solução fortificada, de concentração $15 \mu\text{g/L}$. A tabela 26 mostra os valores obtidos para todas as amostras e pode-se constatar que os valores se encontram no intervalo devido, o que permite afirmar que o método é específico.

Tabela 26 – Teste de recuperação (%) de adição padrão em todas as amostras para o chumbo (os resultados são referentes ao valor médio (n=3)).

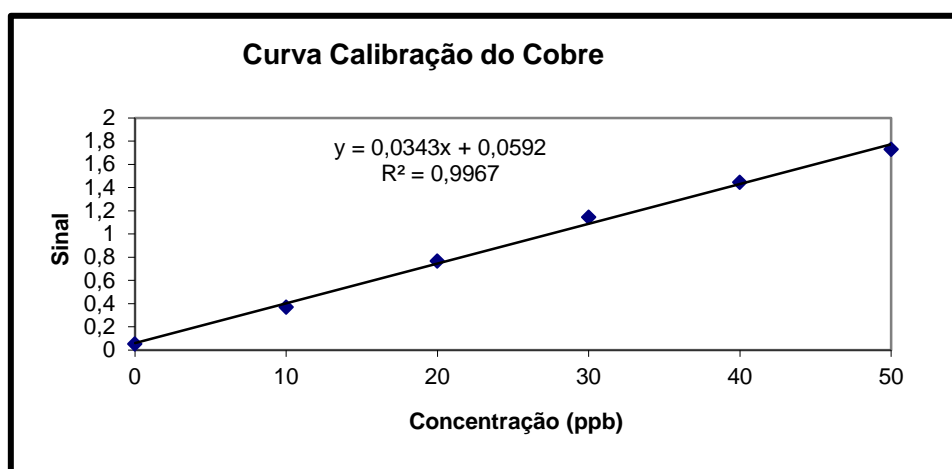
Amostra	Concentração da amostra (µg/L)	Padrão recuperado (µg/L)	Taxa de recuperação %
A	26,643	44,52	119
B	19,027	32,34	89
C	26,583	41,54	100
D	30,190	48,32	121
E	6,065	22,08	107
F	23,803	40,34	110
G	6,840	24,40	117
H	22,433	39,3	112
I	17,737	35,92	121
J	16,120	32,56	109
K	14,530	31,78	115
L	44,930	58,42	90
M	44,447	59,9	103
N	8,607	22,012	89
O	19,553	37,96	122
P	67,793	28,86	103
Q	<LQ*	15,12	113
R	13,370	28,86	103
S	18,630	36,04	116
T	11,997	28	107
U	13,037	29,68	111
V	16,567	30,32	92
W	19,270	36,48	115

* Para as amostras cuja concentração foi inferior ao LQ considerou-se o valor zero de concentração.

1.1.4. Cobre

O gráfico 4 apresenta a curva de calibração obtida para o cobre. Esta mesma curva foi utilizada quer para a validação de método quer para o cálculo da concentração do metal nas amostras. Esta curva é delineada por pontos que correspondem à média de três leituras sobre o mesmo padrão.

Gráfico 4 – Curva de calibração do cobre.



Através de estudos estatísticos é importante retirar alguns dados da curva de calibração, dados estes que irão caracterizar a linearidade do método. A tabela 27 apresenta os dados deste estudo.

Tabela 27 – Equações das curvas de calibração linear e não linear e respectivos dados estatísticos para a avaliação da linearidade do método utilizado para o cobre.

Equação da função linear	$y = 0,0343x + 0,0592$
Declive	0,0343
Ordenada na origem	0,0592
R^2	0,997
Desvio padrão residual da função linear	0,261
Equação da função não linear	$y = -1E-04x^2 + 0,0392x + 0,0262$
Desvio padrão residual da função não linear	0,365
DS^2	-0,052
Valor teste - PG	-0,052
Valor tabelado da distribuição F para 95% de confiança	6,39

Valor tabelado da distribuição F para 99% de confiança	15,98
--	-------

O ajuste da gama de trabalho é realizado através da comparação de variâncias entre os dois padrões de menor e maior concentração da recta. Para o cobre, foi feita a leitura dos padrões de 10 e 50 µg/L. A tabela 28 apresenta os valores obtidos para cada padrão.

Tabela 28 – Resultados das repetições (n=10) dos padrões de 10 µg/L e 50 µg/L de cobre.

Dados	10 µg/L	50 µg/L
Média (µg/L)	9,811	47,759
Desvio padrão	0,415	0,554
Variância	0,172	0,308
RSD (%)	4,228	1,161

Os valores das variâncias são utilizados para calcular o valor PG que neste caso foi 1,789, que comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, para um intervalo de confiança de 95%, 3,18, é inferior. Logo, pode-se afirmar que a gama de trabalho está ajustada à curva de calibração do método, visto não terem sido encontradas diferenças nas variâncias dos dois padrões estudados.

Para determinar os limiares analíticos foi realizada a leitura de brancos. A tabela 29 mostra os valores obtidos para o limite de detecção e de quantificação.

Tabela 29 – Resultados obtidos da leitura de brancos (n=10), para o cobre.

Média (µg/L)	7,452
Desvio padrão	0,525
LD	9,184
LQ	12,701

O estudo de precisão intermédia teve por base a leitura (n=10) de um determinado padrão, em três dias diferentes não consecutivos. O padrão utilizado foi o de 30 µg/L. A tabela 30 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 30 – Valores de desvio padrão residual (%), referentes ao estudo de precisão intermédia do cobre.

	Valor esperado (µg/L)	Valor médio obtido (µg/L)	RSD (%)
Cobre	30	29,814	2,140

O estudo de repetibilidade foi realizado através da leitura (n=10) de três padrões diferentes e independentes, presentes na curva de calibração. Para cada parão foi calculada a percentagem de RSD, sendo aconselhável apresentar um valor inferior a 5%. A tabela 31 expõe os resultados obtidos.

Tabela 31 – Valores de desvio padrão residual (%), referentes ao estudo de repetibilidade do cobre.

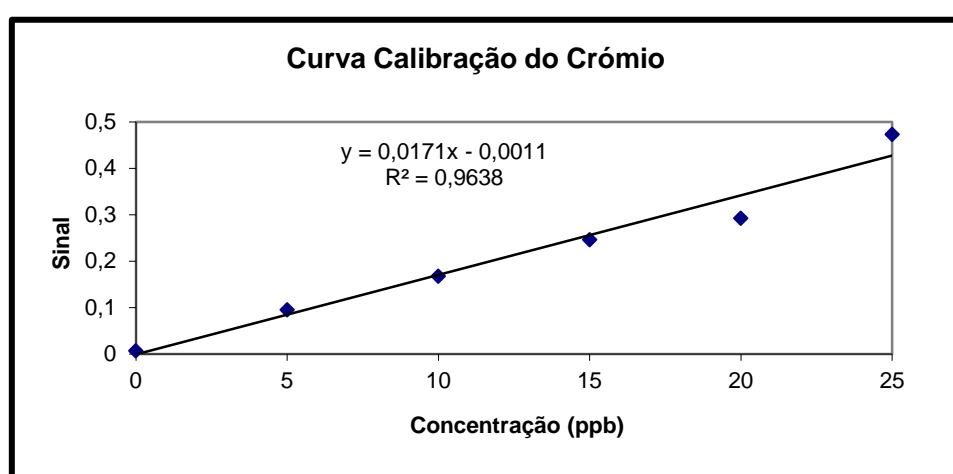
	10 µg/L	30 µg/L	50 µg/L
RSD	3,532	2,632	1,169

A exactidão do método foi testada utilizando o MRC. Destas leituras (n=10) obtém-se um valor médio de concentração para o cobre. Este valor médio é relacionado matematicamente com o valor fornecido pela casa comercial do MRC, obtendo-se um valor de erro total, em percentagem. Para o cobre o valor de erro total foi 2,104%.

1.1.5. Crómio

Para a validação do método utilizado para o crómio foi determinada uma curva de calibração. A curva de calibração foi utilizada para toda a validação do método e também para a determinação dos valores de concentração do metal nas amostras. A cada ponto da curva está associada um valor médio de três leituras de cada padrão. O gráfico 5 ilustra a curva de calibração.

Gráfico 5 – Curva de calibração do Crómio.



Através do estudo estatístico da recta linear obtém-se valores importantes para a caracterização da linearidade do método. A tabela 32 apresenta esses mesmos resultados. O valor obtido para o R^2 revela o ajuste linear da curva. Também o valor teste PG, que considera as duas equações apresentadas, mostra a linearidade da curva, já que é um valor inferior ao valor tabelado da distribuição de F. Assim, pode-se concluir que a função de calibração é linear, para o crómio.

Tabela 32 – Equações das curvas de calibração linear e não linear e respectivos dados estatísticos para a avaliação da linearidade do método utilizado para o crómio.

Equação da função linear	$y = 0,0171x - 0,0011$
Declive	0,017
Ordenada na origem	-0,001
R^2	0,964

Desvio padrão residual da função linear	0,0168
Equação da função não linear	$y = 0,0003x^2 + 0,0108x + 0,02$
Desvio padrão residual da função não linear	0,140
DS^2	0,224
Valor teste - PG	2,555
Valor tabelado da distribuição F para 95% de confiança	6,39
Valor tabelado da distribuição F para 99% de confiança	15,98

A gama de trabalho do método foi devidamente ajustada, através do estudo das variâncias na leitura ($n=10$) do padrão de menor e maior concentração da curva. A aplicação do teste de homogeneidade de variâncias permite avaliar o ajuste. A tabela 33 apresenta os valores para o padrão de 5 e 25 $\mu\text{g/L}$.

Tabela 33 – Resultados da leitura ($n=10$) dos padrões de 5 $\mu\text{g/L}$ e de 25 $\mu\text{g/L}$ de cromo.

Média ($\mu\text{g/L}$)	7,923	28,181
Desvio padrão	0,623	1,619
Variância	0,388	2,621
RSD (%)	7,864	5,744

Os resultados obtidos para a variância foram comparados e essa comparação origina um valor PG, que foi de 0,148. Tendo em conta o valor tabelado pela distribuição de F, 3,18, o PG obtido é inferior. Assim sendo a gama de trabalho está ajustada ao método em estudo, devido ao ter sido provado que não existem diferenças nas variâncias dos padrões.

Os limites analíticos do estudo foram obtidos pela leitura de brancos. A tabela 34 apresenta os valores obtidos quer para o limite de detecção quer para o limite de quantificação.

Tabela 34 – Resultados obtidos da leitura (n=10) de brancos, para o crómio.

Média ($\mu\text{g/L}$)	2,194
Desvio padrão	0,723
LD	4,581
LQ	9,426

Os estudos de precisão intermédia foram realizados através da leitura (n=10) do padrão de 15 $\mu\text{g/L}$, em três dias diferentes não consecutivos. O valor percentual de RSD deverá ser inferior a 5%. A tabela 35 expõe esses mesmos resultados.

Tabela 35 – Valor de desvio padrão residual (%) referente ao estudo de precisão intermédia, do crómio (n=30).

	Valor esperado ($\mu\text{g/L}$)	Valor médio obtido ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
Crómio	15	17,191	3,478

A repetibilidade do método foi avaliada através da leitura (n=10) de três padrões diferentes e independentes, pertencentes à curva de calibração. A cada padrão está associada uma percentagem de RSD que deverá ser inferior a 5%. A tabela 36 apresenta os resultados obtidos para o estudo da repetibilidade.

Tabela 36 – Valores de desvio padrão residual (%) referentes ao estudo de repetibilidade, para o crómio

	5 $\mu\text{g/L}$	15 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$
RSD	4,650	2,300	4,450

A exactidão do método foi estudada através da leitura (n=10) do MRC. Associada a estas repetições está o valor médio da concentração do metal no MRC. Este valor médio é relacionado com o valor descrito nas especificações da casa comercial. O valor de erro para o crómio foi 4,870%.

A especificidade/selectividade do método foi testada através o teste de recuperação. Para o cromo foi utilizada uma solução fortificada, de concentração 15 µg/L. A tabela 37 mostra os valores obtidos para todas as amostras e pode-se constatar que os valores se encontram no intervalo devido, o que permite afirmar que o método é específico.

Tabela 37 – Teste de recuperação (%) de adição padrão em todas as amostras para o cromo (os resultados são referentes ao valor médio n=3).

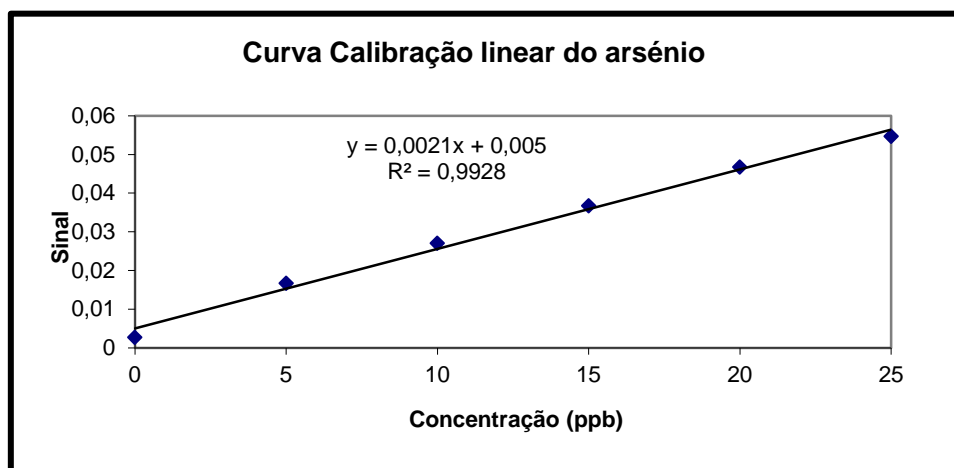
Amostra	Concentração da amostra (µg/L)	Padrão recuperado (µg/L)	Taxa de recuperação %
A	19,65	34,998	102,32
B	17,32	32,156	98,907
C	10,49	24,75	95,067
D	42,27	58	104,889
E	38,77	53,6	98,867
F	12,80	27,798	100,010
G	131,5	148,002	110,013
H	23,76	38,602	98,947
I	106	120,77	98,467
J	106,433	121,798	102,431
K	27,56	44,046	109,907
L	43,857	60,618	111,742
M	128,933	142,912	93,191
N	19,827	34,878	100,342
O	29,35	45,174	105,493
P	55,373	72,004	110,871
Q	13,37	29,006	104,24
R	6,404	21,798	102,204
S	13,803	29,134	102,204
T	11,32	26,598	101,853
U	13,50	29,058	103,742
V	66,037	83,134	113,982
W	53,347	69,578	108,209

1.2. Validação dos métodos analisados por HGAAS

1.2.1. Arsénio

Para a validação do método utilizado para o arsénio foi determinada uma curva de calibração. A curva de calibração foi utilizada para toda a validação do método e também para a determinação dos valores de concentração do metal nas amostras. A cada ponto da curva está associada um valor médio de três leituras de cada padrão. O gráfico 5 ilustra a curva de calibração.

Gráfico 6 – Curva de calibração do arsénio.



Através do estudo estatístico da recta linear obtém-se valores importantes para a caracterização da linearidade do método. A tabela 38 apresenta esses mesmos resultados. O valor obtido para o R^2 revela o ajuste linear da curva. Também o valor teste PG, que considera as duas equações apresentadas, mostra a linearidade da curva, já que é um valor inferior ao valor tabelado da distribuição de F. Assim, pode-se concluir que a função de calibração é linear, para o arsénio.

Tabela 38 – Equações das curvas de calibração linear e não linear e respectivos dados estatísticos para a avaliação da linearidade do método utilizado para o arsénio.

Equação da função linear	$y = 0,0021x + 0,005$
Declive	0,0021
Ordenada na origem	0,005
R^2	0,993
Desvio padrão residual da função linear	0,064
Equação da função não linear	$y = -0,0002x^2 + 0,0026x + 0,0032$
Desvio padrão residual da função não linear	0,068
DS^2	0,055
Valor teste - PG	0,640
Valor tabelado da distribuição F para 95% de confiança	6,39
Valor tabelado da distribuição F para 99% de confiança	15,98

A gama de trabalho do método foi devidamente ajustada, através do estudo das variâncias na leitura ($n=10$) do padrão de menor e maior concentração da curva. A aplicação do teste de homogeneidade de variâncias permite avaliar o ajuste. A tabela 39 apresenta os valores para o padrão de 5 e 25 $\mu\text{g/L}$.

Tabela 39 – Resultados da leitura ($n=10$) do padrão de 5 $\mu\text{g/L}$ e de 25 $\mu\text{g/L}$ de arsénio.

Dados	5 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$
Média ($\mu\text{g/L}$)	5,371	24,814
Desvio padrão	0,203	1,214
Variância	0,041	1,475
RSD (%)	3,773	4,894

Os resultados obtidos para a variância foram comparados e essa comparação origina um valor PG, que foi de 0,028. Tendo em conta o valor tabelado pela distribuição de F, 3,18, o PG obtido é inferior. Assim sendo a gama de trabalho está ajustada ao método em estudo, uma vez que não existem diferenças nas variâncias dos padrões.

Os limites analíticos do estudo foram obtidos pela leitura de brancos. A tabela 40 apresenta os valores obtidos quer para o limite de detecção quer para o limite de quantificação.

Tabela 40 – Resultados obtidos da leitura (n=10) de brancos, para o arsénio.

Média (µg/L)	0,0026
Desvio padrão	0,001
LD	0,004
LQ	0,008

Os estudos de precisão intermédia foram realizados através da leitura (n=10) do padrão de 15 µg/L, em três dias diferentes não consecutivos. O valor percentual de RSD deverá ser inferior a 5%. A tabela 41 expõe esses mesmos resultados.

Tabela 41 – Valor de desvio padrão residual (%) referente ao estudo de precisão intermédia, do arsénio (n=30).

	Valor esperado (µg/L)	Valor médio obtido (µg/L)	RSD (%)
Arsénio	15	15,636	4,272

A repetibilidade do método foi avaliada através da leitura (n=10) de três padrões diferentes e independentes, pertencentes à curva de calibração. A cada padrão está associada uma percentagem de RSD que deverá ser inferior a 5%. A tabela 42 apresenta os resultados obtidos para o estudo da repetibilidade.

Tabela 42 – Valores de desvio padrão residual (%) referentes ao estudo de repetibilidade, para o arsénio.

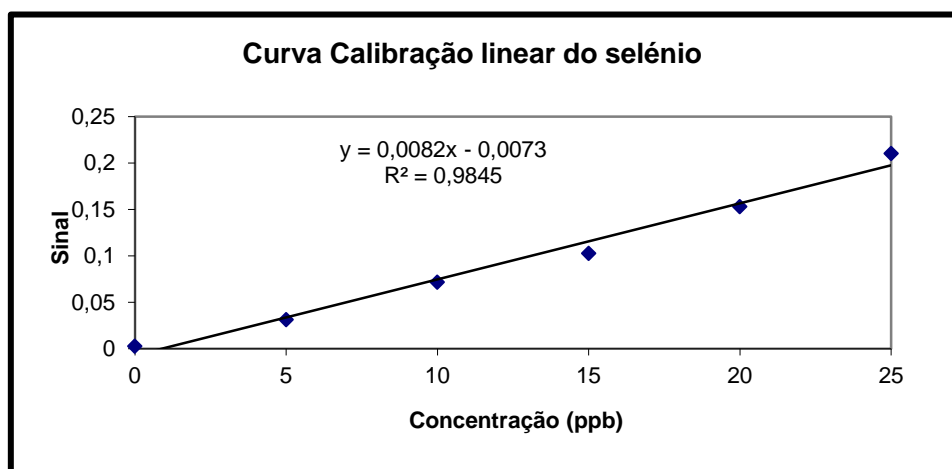
	5 µg/L	15 µg/L	25 µg/L
RSD	5,677	3,523	4,995

A exactidão do método foi estudada através da leitura ($n=10$) do MRC. Associada a estas repetições está o valor médio da concentração do metal no MRC. Este valor médio é relacionado com o valor descrito nas especificações da casa comercial. O valor de erro para o crómio foi 5,158%.

1.2.2. Selénio

Para a validação do método utilizado para o selénio foi determinada uma curva de calibração. A curva de calibração foi utilizada para toda a validação do método e também para a determinação dos valores de concentração do metal nas amostras. A cada ponto da curva está associada um valor médio de três leituras de cada padrão. O gráfico 7 ilustra a curva de calibração.

Gráfico 7 – Curva de calibração do selénio.



Através do estudo estatístico da recta linear obtém-se valores importantes para a caracterização da linearidade do método. A tabela 43 apresenta esses mesmos resultados. O valor obtido para o R^2 revela o ajuste linear da curva. Também o valor teste PG, que considera as duas equações apresentadas, mostra a linearidade da curva, já que é um valor inferior ao valor tabelado da distribuição de F. Assim, pode-se concluir que a função de calibração é linear, para o selénio.

Tabela 43 – Equações das curvas de calibração linear e não linear e respectivos dados estatísticos para a avaliação da linearidade do método utilizado para o selênio.

Equação da função linear	$y = 0,0082x - 0,0073$
Declive	0,0082
Ordenada na origem	-0,0073
R^2	0,9845
Desvio padrão residual da função linear	0,113
Equação da função não linear	$y = 0,0001x^2 + 0,0049x + 0,0036$
Desvio padrão residual da função não linear	0,061
DS^2	0,218
Valor teste - PG	3,670
Valor tabelado da distribuição F para 95% de confiança	6,39
Valor tabelado da distribuição F para 99% de confiança	15,98

A gama de trabalho do método foi devidamente ajustada, através do estudo das variâncias na leitura ($n=10$) do padrão de menor e maior concentração da curva. A aplicação do teste de homogeneidade de variâncias permite avaliar o ajuste. A tabela 44 apresenta os valores para o padrão de 5 e 25 $\mu\text{g/L}$.

Tabela 44 – Resultados da leitura ($n=10$) do padrão de 5 $\mu\text{g/L}$ e de 25 $\mu\text{g/L}$ de selênio.

Dados	5 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$
Média ($\mu\text{g/L}$)	5,550	25,027
Desvio padrão	0,281	0,491
Variância	0,079	0,241
RSD (%)	5,059	1,961

Os resultados obtidos para a variância foram comparados e essa comparação origina um valor PG, que foi de 3,055. Tendo em conta o valor tabelado pela distribuição de F, 3,18, o PG obtido é inferior. Assim sendo a gama de trabalho está ajustada ao método em estudo, devido ao ter sido provado que não existem diferenças nas variâncias dos padrões.

Os limites analíticos do estudo foram obtidos pela leitura de brancos. A tabela 45 apresenta os valores obtidos quer para o limite de detecção quer para o limite de quantificação.

Tabela 45 – Resultados obtidos da leitura (n=10) de brancos, para o selénio.

Média ($\mu\text{g/L}$)	0,756
Desvio padrão	0,035
LD	0,869
LQ	1,103

Os estudos de precisão intermédia foram realizados através da leitura (n=10) do padrão de 15 $\mu\text{g/L}$, em três dias diferentes não consecutivos. O valor percentual de RSD deverá ser inferior a 5%. A tabela 46 expõe esses mesmos resultados.

Tabela 46 – Valor de desvio padrão residual (%) referente ao estudo de precisão intermédia, do selénio (n=30).

	Valor esperado ($\mu\text{g/L}$)	Valor médio obtido ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
Selénio	15	14,618	2,782

A repetibilidade do método foi avaliada através da leitura (n=10) de três padrões diferentes e independentes, pertencentes à curva de calibração. A cada padrão está associada uma percentagem de RSD que deverá ser inferior a 5%. A tabela 47 apresenta os resultados obtidos para o estudo da repetibilidade.

Tabela 47 – Valores de desvio padrão residual (%) referentes ao estudo de repetibilidade, para o selénio.

	5 $\mu\text{g/L}$	15 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$
RSD	5,290	1,568	2,102

A exactidão do método foi estudada através da leitura (n=10) do MRC. Associada a estas repetições está o valor médio da concentração do metal no MRC. Este valor médio é relacionado com o valor descrito nas especificações da casa comercial. O valor de erro para o selénio foi 3,402%.

1.3. Validação do método de digestão

De forma a ser validado o método experimental desde início, foi realizado um teste de recuperação a três amostras, em que antes de a amostra ser exposta às altas temperaturas da mufla foram adicionados padrões com a mesma concentração usada nos testes de recuperação anteriormente referidos (padrão de cádmio de 5 µg/L, padrão de chumbo de 15 µg/L e padrão de crómio de 15 µg/L). Foram expostas à temperatura de 450°C duas amostras iguais, simultaneamente, e apenas a uma delas foi adicionado o padrão. A tabela 48 representa os valores obtidos.

Tabela 48 – Teste de recuperação (%) de adição padrão em três amostras (os resultados são referentes ao valor médio n=3).

Amostra	Metal	Concentração da amostra (µg/L)	Padrão recuperado (µg/L)	Taxa de recuperação (%)
G	Cádmio	3,567	8,467	98,00
	Chumbo	5,047	20,893	105,64
	Crómio	121,27	136,32	100,33
H	Cádmio	2,546	7,003	89,14
	Chumbo	23,675	38,201	96,84
	Crómio	23,52	38,25	98,20
I	Cádmio	1,989	7,326	106,74
	Chumbo	16,898	31,045	94,31
	Crómio	96,71	111,2	96,60

2. QUANTIFICAÇÃO DE METAIS NA AMOSTRA

A análise quantitativa dos metais nas amostras estudadas permitiu a construção das tabelas de resultados, abaixo apresentadas. De forma a facilitar a apresentação dos resultados obtidos, as amostras foram agrupadas segundo o tipo de produção do chá. A tabela 49 apresenta as concentrações obtidos para as amostras referentes à produção tradicional, em que cada valor é resultante de uma média de três repetições para cada amostra.

Tabela 49 – Análise quantitativa de metais em amostras (n=3) de chá de produção tradicional.

Amostras	Metais (µg/g)						
	Alumínio	Arsénio	Cádmio	Crómio	Cobre	Chumbo	Selénio
E	11,19	0,12	0,03	0,58	3,10	0,09	0,03
F	11,39	0,06	0,03	0,19	3,36	0,36	0,03
G	10,32	0,05	0,04	1,97	3,32	0,10	0,03
H	9,80	0,12	0,04	0,36	2,82	0,34	0,04
I	9,38	0,01	0,02	1,59	3,03	0,27	0,03
J	10,05	0,02	0,01	1,60	2,49	0,24	0,03
K	7,01	0,02	0,01	0,41	2,82	0,22	0,03
L	9,10	0,07	0,05	0,66	3,19	0,67	0,03
M	8,34	0,05	0,03	1,93	3,18	0,67	0,04
N	6,55	0,03	0,01	0,30	1,41	0,13	0,02
O	8,58	0,08	0,02	0,44	2,90	0,29	0,03
S	6,76	0,07	0,02	0,21	2,37	0,28	0,05
T	7,87	0,03	0,01	0,17	2,51	0,18	0,04
U	7,89	0,02	0,01	0,20	2,36	0,20	0,02
W	7,03	0,05	0,10	0,80	3,67	0,29	0,05

A tabela 50 apresenta os resultados obtidos para as amostras de chá de produção biológica.

Tabela 50 – Análise quantitativa de metais em amostras (n=3) de chá de produção biológica.

Amostras	Metais (µg/g)						
	Alumínio	Arsénio	Cádmio	Crómio	Cobre	Chumbo	Selénio
A	10,77	0,10	0,03	0,29	2,16	0,40	0,03
B	10,75	0,08	0,02	0,26	2,43	0,29	0,03
C	10,36	0,04	0,02	0,16	3,81	0,40	0,02
D	9,55	0,07	0,03	0,63	2,52	0,45	0,03
P	6,34	0,04	0,08	0,83	3,52	1,02	0,03
Q	8,10	0,04	0,00	0,20	1,35	< LQ*	0,17
R	7,26	0,03	0,01	0,10	2,77	0,20	0,07
V	9,76	0,04	0,06	0,99	3,96	0,25	0,05

* < LQ – valor de concentração inferior ao LQ.

Após a análise quantitativa das amostras realizou-se o teste estatístico de análise de variâncias (ANOVA), através do programa informático SPSS®, que permitiu testar se existem diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações dos metais nas amostras de produção tradicional e as amostras de produção biológica. A tabela 51, abaixo apresentada, revela que não existem diferenças entre os dois grupos, em nenhum metal, já que todos os valores de *p-value* são superiores a 0,05.

Tabela 51 – Resultados do teste ANOVA aplicado nos grupos de amostra de produção tradicional e de produção biológica.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
aluminio	Between Groups	,678	1	,678	,259	,616
	Within Groups	54,936	21	2,616		
	Total	55,615	22			
arsénio	Between Groups	1,868	1	1,868	,511	,483
	Within Groups	76,821	21	3,658		
	Total	78,689	22			
cádmio	Between Groups	,000	1	,000	,058	,812
	Within Groups	,013	21	,001		
	Total	,013	22			
crómio	Between Groups	,562	1	,562	1,697	,207
	Within Groups	6,954	21	,331		
	Total	7,516	22			
cobre	Between Groups	,002	1	,002	,005	,947
	Within Groups	9,874	21	,470		
	Total	9,876	22			
chumbo	Between Groups	,040	1	,040	,806	,380
	Within Groups	1,043	21	,050		
	Total	1,083	22			
selénio	Between Groups	,002	1	,002	2,493	,129
	Within Groups	,018	21	,001		
	Total	,020	22			

A comparação entre os diferentes tipos de chá (chá branco, verde e preto) também foi realizada através do mesmo teste estatístico utilizado anteriormente, que permitiu avaliar se há diferenças na concentração de metais entre os diferentes grupos. Dos testes realizados realça-se que existem pequenas diferenças significativas estatisticamente. Exemplo disso é o caso do arsénio que é significativamente diferente nos chás verde e preto, apresentando um *p-value* de 0,05. O cobre também apresenta valores significativamente diferentes entre o chá preto e o chá branco, com um *p-value* de 0,054. (ver anexo IV)

No total de amostras analisadas também se incluíram algumas amostras de chás de plantas diferentes da *Camellia sinensis*, com o objectivo de comparar os valores de concentração e assim concluir se existem diferenças entre os dois grupos. Para esta comparação foi aplicado o teste ANOVA. Após a análise dos resultados estatísticos conclui-se que existem diferenças entre os

dois grupos para os metais alumínio e selénio, visto apresentarem valores de *p-value* inferior a 0,05. (ver anexo IV)

De forma a conseguir-se entender melhor quais as amostras que obtiveram valores mais elevados de metais e ainda que metais são mais abundantes no chá são apresentados dois gráficos (8 e 9) que ilustram a concentração de todos os metais em cada amostra individualmente, agrupados pelo tipo de produção.

Gráfico 8 – Resultados obtidos para as amostras de chá produzido tradicionalmente.

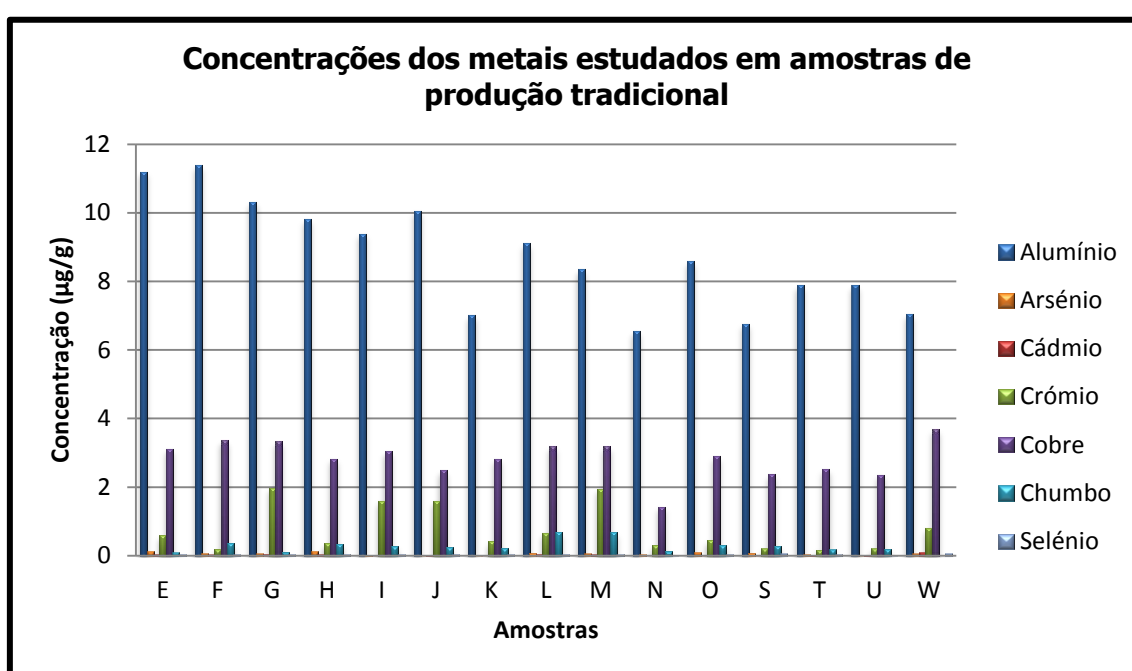
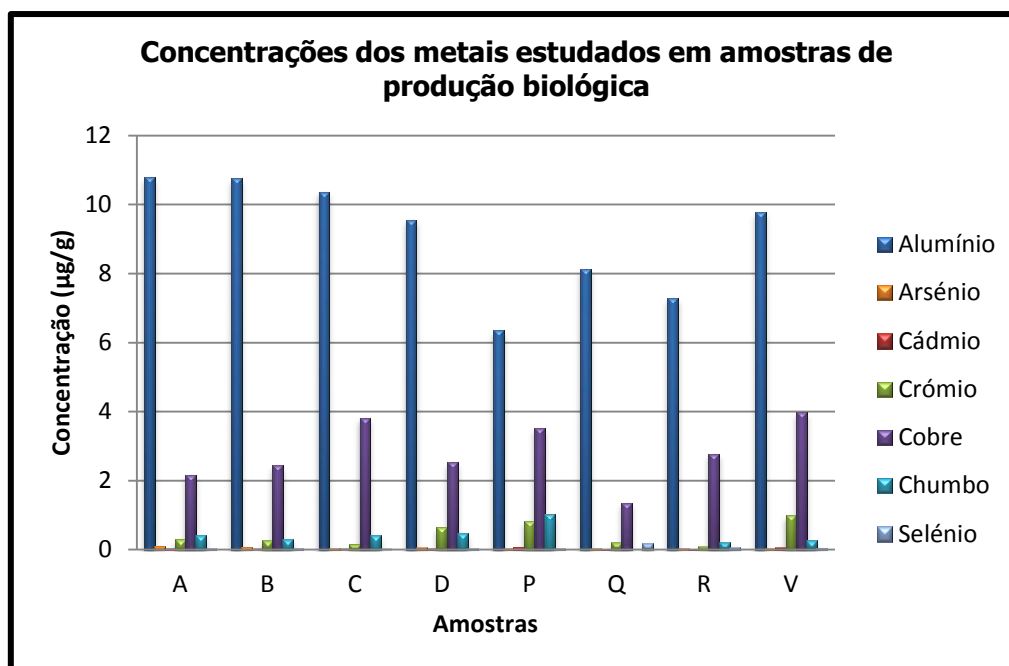


Gráfico 9 - Resultados obtidos para as amostras de chá de produção biológica.



Através da análise directa dos gráficos acima apresentados torna-se evidente que os metais mais abundantes, independentemente do tipo de produção, são o alumínio e o cobre. (ver anexo V)

A contaminação das folhas de chá por metais tem merecido particular atenção também noutros locais. Por exemplo, foi feito um estudo sobre presença de metais essenciais e tóxicos em folhas de chá preto e nas suas infusões, produzido e comercializado no Irão, usando ICP-AES, em que os valores para o alumínio (968,2 µg/g) foram também os mais elevados, seguido pelo níquel, chumbo, crómio e cádmio (Salahinejad & Aflaki, 2010).

Noutro estudo foram analisadas folhas de chá preto e as suas infusões para estudar quais os elementos presentes nas mesmas, concluindo que o chá é rico e possui uma imensa variedade de elementos. O alumínio e o cobre foram determinados por ICP-AES e foram determinadas concentrações elevadas (807 µg/g e 27,7 µg/g, respectivamente), comparativamente a outros metais como o chumbo e o cádmio que obtiveram 0,709 µg/g e 0,018 µg/g, respectivamente (Matsuura, Hokura, Katsuki, Itoh, & Haraguchi, 2001).

CAPÍTULO IV - CONCLUSÃO

O estudo realizado permitiu perceber que dos metais analisados o alumínio e o cobre são os elementos mais abundantes nos chás testados, apesar de apresentarem valores abaixo dos valores estipulados como limite por algumas organizações como a World Health Organization (WHO) e Food and Drug Administration (FDA). A WHO indica que como limites os seguintes valores para alguns dos metais estudados: cádmio 0,2 µg/g, chumbo 10,0 µg/g, arsénio 10,0 µg/g e cobre 20,0 µg/g. A FDA apresenta como valores de limite de concentração de metais em alimentos e fármacos: cádmio 0,3 µg/g, chumbo 10,0 µg/g, arsénio 10,0 µg/g e cobre 20,0 µg/g.

Ainda se pode concluir que as possíveis diferenças entre os dois tipos de produção não são significativas, pelo menos em relação à concentração de metais. Contudo, é de referir que o número de amostras referentes à produção biológica é muito inferior ao número de amostras de produção tradicional, o que retira alguma credibilidade à comparação.

Mesmo assim, as variações na produção dos diferentes tipos de chá poderiam afectar as concentrações de metais, tendo sido detectadas pequenas diferenças entre o chá verde e preto nas concentrações de arsénio e entre o chá preto e chá branco para as concentrações de cobre.

Algumas das amostras são constituídas por outras plantas que não a *Camellia sinensis*. A comparação que se fez entre as diferentes plantas de chá mostrou que são poucas as diferenças, apenas tendo sido encontrado um valor de *p-value* inferior a 0,05 para o selénio e o cobre.

Tendo em conta a bibliografia mais recente seria interessante, como método para o estudo quantitativo de metais, utilizar outros métodos actualizados como ICP-AES ou ICP-MS, que apresentam valores de sensibilidade superiores ao GFAAS. A escolha pela HGAAS parece ser a mais adequada para a determinação quantitativa de arsénio e selénio, visto serem

dois metais que geram hidretos e os resultados obtidos da validação mostram que o método é sensível e bastante reprodutível.

Como principal limitação ao estudo é de apontar a pouca variedade de marcas de chá, havendo sim muita variedade de outras plantas ou até mesmo de misturas de várias plantas com a *Camellia sinensis*. Por isso, como estudos futuros seria interessante tentar abranger mais plantas e poder aumentar o número de amostras em estudo.

BIBLIOGRAFIA

- ATSDR. (1989). Toxicological Profile for Chromium.
- ATSDR. (1999). Toxicological Profile for Lead.
- ATSDR. (2000). Toxicological Profile for Arsenic.
- ATSDR. (2008). Toxicological Profile for Aluminum.
- ATSDR. (2009). Toxicological Profile for Copper.
- Andrade, M. G. K., Boa Morte, E. S., Batista, D. S. C. M., Castro, J. T., Barbosa, J. T. P., Teixeira, A. P., Fernandes, A. P., et al. (2008). Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 67–92.
- Aras, N. k., & Ataman, O. Y. (2006). *Trace Element Analysis of Food and Diet*. Copyright.
- Araya, M., Olivares, M., Pizarro, F., Llanos, A., Figueroa, G., & Uauy, R. (2004). Community-Based Randomized Double-Blind Study of Gastrointestinal Effect and Copper Exposure in Drinking Water. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 1068–1073.
- Arruda, M. A. Z. (2007). *Trends in Sample Preparation*. Nova Science Publishers, Inc.
- Ashraf, W., & Mian, A. A. (2008). Levels of selected heavy metals in black tea varieties consumed in Saudi Arabia. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 81(1), 101–4.
- Awasom, I. (2011). Tea. *Journal of Agricultural & Food Information*, 12(1), 12–22.
- Birchall, J. D., & Chappell, J. S. (1989). Aluminium, Water Chemistry, and Alzheimer's Disease. *The Lancet*, 333(8644), 953.
- Buldini, P. L., Ricci, L., & Sharma, J. L. (2002). Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. *Journal of chromatography. A*, 975(1), 47–70.
- Büyükbacı, A., & El, S. N. (2008). Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 63(1), 27–33.

- Casarett, & Doull's. (2008). *Toxicology, The Basic Science of Poisons* (7th ed.).
- Chacko, S. M., Thambi, P. T., Kuttan, R., & Nishigaki, I. (2010). Beneficial effects of green tea: a literature review. *Chinese medicine*, 5, 13.
- Chan, E. W. C., Soh, E. Y., Tie, P. P., & Law, Y. P. (2011a). Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy research*, 3(4), 266–72.
- Chan, E. W. C., Soh, E. Y., Tie, P. P., & Law, Y. P. (2011b). Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy research*, 3(4), 266–72.
- Cooper, R., Morré, D. J., & Morré, D. M. (2005). Medicinal benefits of green tea: Part I. Review of noncancer health benefits. *Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)*, 11(3), 521–8.
- Csuros, M., & Csuros, C. (2000). *Environmental sampling and analysis for metals*. USA: Lewis Publishers.
- Fewtrell, L., Kay, D., & MacGill, S. (2001). A review of the science behind drinking water standards for copper. *International journal of environmental health research*, 11(2), 161–7.
- Gaetke, L. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2), 147–163.
- Gomez, M. R., Cerutti, S., Sombra, L. L., Silva, M. F., & Martínez, L. D. (2007). Determination of heavy metals for the quality control in Argentinian herbal medicines by ETAAS and ICP-OES. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 45(6), 1060–4.
- Gräske, A., Thuvander, A., Johannisson, A., Gadhasson, I., Schütz, A., Festin, R., & Wicklund Glynn, A. (2000). Influence of aluminium on the immune system--an experimental study on volunteers. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 13(2), 123–33.
- Hamilton-Miller, J., & Shah, S. (2005). Medicinal benefits of green tea. *J. Alternative and Complementary Medicine*, 11(3), 521–528.
- Hayacibara, M. F., Queiroz, C. S., Pereira, C., Tabchoury, M., & Cury, J. A. (2004). Fluoride and aluminum in teas and tea-based beverages Flúor e alumínio em chás e bebidas à base de chás, 38(1), 100–105.
- Hoening, M. (2001). Preparation steps in environmental trace element analysis - facts and traps. *Talanta*, 54(6), 1021–38.

- INCHEM. (1997). Documents.
- Jain, C. ., & Ali, I. (2000). Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water Research*, 34(17), 4304–4312.
- Jin, C. W., He, Y. F., Zhang, K., Zhou, G. D., Shi, J. L., & Zheng, S. J. (2005). Lead contamination in tea leaves and non-edaphic factors affecting it. *Chemosphere*, 61(5), 726–32.
- Jouhanneau, P., Raisbeck, G. M., Yiou, F., Lacour, B., Banide, H., & Drüeke, T. B. (1997). Gastrointestinal absorption, tissue retention, and urinary excretion of dietary aluminum in rats determined by using ²⁶Al. *Clinical chemistry*, 43(6 Pt 1), 1023–8.
- Júnior, D. S., Krug, F. J., Pereira, M. de G., & Korn, M. (2006). Currents on Ultrasound-Assisted Extraction for Sample Preparation and Spectroscopic Analytes Determination. *Applied Spectroscopy Reviews*, 41(3), 305–321.
- Knechtel, J. R., & Fraser, J. L. (1978). Communication. Preparation of a stable borohydride solution for use in atomic-absorption studies. *The Analyst*, 103(1222), 104.
- Ko, S.-G., Go, H., Sun, S., Lee, S., Park, W., Choi, Y., Song, Y., et al. (2011). Green tea consumption, abdominal obesity as related factors of lacunar infarction in Korean women. *The journal of nutrition, health & aging*, 15(7), 542–50.
- Krishna, M. V. B., & Arunachalam, J. (2004). Ultrasound-assisted extraction procedure for the fast estimation of major, minor and trace elements in lichen and mussel samples by ICP-MS and ICP-AES. *Analytica Chimica Acta*, 522(2), 179–187.
- Lajunen, L. H. J., & Peramaki, P. (2004). *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission* (2nd ed.). The Royal Society of Chemistry.
- Li, S., & Fang, Y. (2012). Heavy Metals in Chinese Therapeutic Foods and Herbs. *Journal of the Chemical ...*, 1–5.
- Liang, S. (2003). *Quantitative remote sensing of land surfaces*.
- Maduro, C., Vale, G., Alves, S., Galesio, M., da Silva, M. D. R. G., Fernandez, C., Catarino, S., et al. (2006). Determination of Cd and Pb in biological reference materials by electrothermal atomic absorption spectrometry: A comparison of three ultrasonic-based sample treatment procedures. *Talanta*, 68(4), 1156–61.
- Matsuura, H., Hokura, a, Katsuki, F., Itoh, a, & Haraguchi, H. (2001). Multielement determination and speciation of major-to-trace elements in

- black tea leaves by ICP-AES and ICP-MS with the aid of size exclusion chromatography. *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 17(3), 391–8.
- Mindak, W. R., & Dolan, S. P. (1999). Determination of Arsenic and Selenium in Food using a Microwave Digestion–Dry Ash Preparation and Flow Injection Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12(2), 111–122.
- Mídio, A. F. (2000). *Toxicologia de alimentos*.
- Salahinejad, M., & Aflaki, F. (2010). Toxic and essential mineral elements content of black tea leaves and their tea infusions consumed in Iran. *Biological trace element research*, 134(1), 109–17.
- Santos, W. P. C., Gramacho, D. R., Teixeira, A. P., Costa, A. C. S., & Korn, M. G. A. (2008). Use of Doehlert design for optimizing the digestion of beans for multi-element determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(1), 1–10.
- Shu, W. S., Zhang, Z. Q., Lan, C. Y., & Wong, M. H. (2003). Fluoride and aluminium concentrations of tea plants and tea products from Sichuan Province, PR China. *Chemosphere*, 52(9), 1475–82.
- Skoog, D., & West, D. (1971). *Principles of Instrumental Analysis*. USA: Rine Hart and Winston, Inc.
- Soylak, M., Tuzen, M., Narin, I., & Sari, H. (2004). Comparison of Microwave , Dry and Wet Digestion Procedures for the Determination of Trace Metal Contents in Spice Samples Produced in Turkey. *Journal of Food and Drug Analysis*, 12(3), 254–258.
- Street, R., & Drábek, O. (2007). Total content and speciation of aluminium in tea leaves and tea infusions. *Food chemistry*, 104(4), 1662–1669.
- Taylor, & Francis. (2000). *Molecular Biology and Toxicology of Metal*.
- Taylor, J., DeWoskin, R., & Ennever, F. (1999). Toxicological Profile for Cadmium. *US Department of Health and Human Services*
- Unachukwu, U. J., Ahmed, S., Kavalier, A., Lyles, J. T., & Kennelly, E. J. (2010). White and green teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): variation in phenolic, methylxanthine, and antioxidant profiles. *Journal of food science*, 75(6), C541–8.

- Vernarelli, J. a, & Lambert, J. D. (2012). Tea consumption is inversely associated with weight status and other markers for metabolic syndrome in US adults. *European journal of nutrition*.
- WHO. (2012). Toxicological evaluations of certain veterinary drug residues in food. *WHO Food Additives Series: 66* (pp. 1–186). Geneva.
- Wang, H., Helliwell, K., & You, X. (2000). Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 68(1), 115–21.
- Weisburger, J. H. (1999). Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 37(9-10), 943–8.
- Welz, B., & Sperling, M. (1999). *Atomic Absorption Spectrometry* (3rd ed.). Germany: Wiley-Vch.
- Yusuf, S., Rehman, Q., & Casscells, W. (2002). Cardiomyopathy in association with selenium deficiency: a case report. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 26(1), 63–66.
- Zietz, B. (2003). Copper concentrations in tap water and possible effects on infant's health. *Environmental Research*, 92(2), 129–138.
- Zietz, B., Dieter, H., Lakomek, M., Schneider, H., Keslergaedtke, B., & Dunkelberg, H. (2003). Epidemiological investigation on chronic copper toxicity to children exposed via the public drinking water supply. *The Science of The Total Environment*, 302(1-3), 127–144.

ANEXOS

ANEXO I

Material de Referência Certificado



CERTIFIED REFERENCE MATERIAL

TM-26.3, lot 1107

A low level fortified sample for trace elements

Trace element standards are made in filtered and diluted Lake Ontario water and are preserved with 0.2% nitric acid. TM-26.3 has concentrations in the low range and is designed for verification of accuracy. Trace element standards are monitored for consistency in Environment Canada Proficiency Testing (PT) studies. "For Information" values indicate insufficient data exists to meet CRM certification criteria. The values and statistics for this CRM are derived from PT studies 81, 83, and 85 dated September 2002, December 2003, and December 2004 respectively. A more detailed report on the methods used in our PT studies for specific parameters is available upon request. Please note that expiry dates of 1 year from the date of shipping are not indicative of sample stability, but rather of sample transport, handling and storage. We strongly recommend that the CRM be tightly capped and refrigerated immediately after use.

Measurand	Value ^a in µg/L	±2σ ^b	C.I. ^c	Studies / Results (N)
Aluminum	69	14	1.4	3 / 88
Antimony	2.7	0.62	0.07	3 / 67
Arsenic	7.9	1.5	0.16	3 / 79
Barium	25	2.4	0.25	3 / 88
Beryllium	3.4	0.58	0.06	3 / 84
Boron	36	6.1	0.81	3 / 57
Cadmium	7.1	1	0.1	3 / 92
Chromium	12.3	1.3	0.14	3 / 88
Cobalt	8.1	1	0.12	3 / 77
Copper	13.4	1.9	0.2	3 / 92
Iron	21	3.6	0.44	3 / 67
Lead	10.5	1.2	0.13	3 / 82
Lithium	6.6	0.87	0.13	3 / 43
Manganese	17	1.4	0.14	3 / 89
Molybdenum	7.6	1.2	0.15	3 / 67
Nickel	10.2	1.3	0.14	3 / 82
Selenium	5.6	1.3	0.16	3 / 85
Strontium	96	7.5	0.84	3 / 78
Thallium	5.2	0.63	0.08	3 / 54
Tin	5.9	0.88	0.14	3 / 41
Titanium	6	0.66	0.09	3 / 54
Uranium	7.5	1	0.13	3 / 62
Vanadium	12.1	1.4	0.15	3 / 83
For information				
Bismuth	3.3	33 results		
Gallium	5.4	18 results		
Rubidium	10	21 results		
Silver	6.9	59 results		
Tungsten	8.4	12 results		
Zinc	39	63 results		

^a Outliers of > 3 std. dev. excluded and are calculated with 'Robust Analysis' Annex C, ISO DIS 13528:2005(E).

^b 2-sigma limit for an individual measurement.

^c 95% confidence interval on the population mean ($\sigma \times 1.96$) + \sqrt{N} .

Last Updated: 20 November 2007

Canada



Certified Reference Materials (CRMs) are valuable and necessary tools for validating the analytical results in environmental research and monitoring programs.

These water reference materials are intended for the verification or development of analytical methods for environmental analysis.

Development and Certification

Reference waters are collected in bulk from various locations across North America. Waters are centrifuged, filtered and stored refrigerated. Certification is by means of large interlaboratory Proficiency Testing (PT) studies. This normally occurs over a minimum time span of 3 years, thus giving a good indication of sample stability and homogeneity.

Stability, Storage and Handling

The certification and stability of CRMs are subject to uncertainties. The inherently complex nature of natural water samples and environmental analyses should be observed as they may not be completely free of errors. CRMs should be handled by qualified personnel with good laboratory practices to ensure their integrity. In addition, CRMs are necessarily shipped by commercial couriers under non-controlled conditions and storage may be subject to foreign and unknown customs regulations.

CRMs should be stored refrigerated, well sealed and in the dark. Care should be taken when subsampling to avoid contamination of the sample bottle. It is recommended that users purchase new CRMs as required or as expiry dates are reached.

Disclaimer, Liability & Warranty

Certified values for these CRMs are based on performance based methods used by laboratories in Environment Canada's interlaboratory PT program. Environment Canada warrants that the materials conform to the certificate values. In the event of a breach

of this warranty, Environment Canada will only be liable for a replacement sample, an equivalent substitute, or the invoice price of the CRM. In no event will Environment Canada be liable for direct, indirect, special, incidental or consequential damages arising from the use of or inability to use the material or documentation, or for the loss of revenue or profit, even if advised of the possibility of such damages.

Further Information

Environment Canada promotes its research and findings and makes them available to the scientific community. Additional information is available on request. Analytical results, any comments or suggestions will be most welcome. Difficulties or discrepancies arising with the certified standards should be communicated immediately.

Comments, concerns, or information inquiries may be addressed to:

Attention: CRM Sales
Environment Canada
National Laboratory for Environmental Testing
867 Lakeshore Road
Burlington, ON L7R 4A6
CANADA

Tel: +1 905-336-4853
Fax: +1 905-336-8914
E-mail: crmsales@ec.gc.ca
Website: English
<http://www.nwri.ca/nlet-lnea/crm-mrc/crm-e.html>
French
<http://www.nwri.ca/nlet-lnea/crm-mrc/crm-f.html>

ANEXO II

Distribuição de F de Snedcor I

Os valores tabelados correspondem aos pontos x tais que: $P(F_n^m \leq x) = 0.95$

m \ n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120
1	161,45	199,50	215,71	224,58	230,16	233,99	236,77	238,88	240,54	241,88	243,90	245,95	248,02	249,05	250,10	251,14	252,20	253,25
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,41	19,43	19,45	19,45	19,46	19,47	19,48	19,49
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,74	8,70	8,66	8,64	8,62	8,59	8,57	8,55
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,91	5,86	5,80	5,77	5,75	5,72	5,69	5,66
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,68	4,62	4,56	4,53	4,50	4,46	4,43	4,40
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,00	3,94	3,87	3,84	3,81	3,77	3,74	3,70
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,57	3,51	3,44	3,41	3,38	3,34	3,30	3,27
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,28	3,22	3,15	3,12	3,08	3,04	3,01	2,97
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,07	3,01	2,94	2,90	2,86	2,83	2,79	2,75
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,91	2,85	2,77	2,74	2,70	2,66	2,62	2,58
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,79	2,72	2,65	2,61	2,57	2,53	2,49	2,45
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,69	2,62	2,54	2,51	2,47	2,43	2,38	2,34
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,60	2,53	2,46	2,42	2,38	2,34	2,30	2,25
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	2,53	2,46	2,39	2,35	2,31	2,27	2,22	2,18
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,48	2,40	2,33	2,29	2,25	2,20	2,16	2,11
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,42	2,35	2,28	2,24	2,19	2,15	2,11	2,06
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	2,38	2,31	2,23	2,19	2,15	2,10	2,06	2,01
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,34	2,27	2,19	2,15	2,11	2,06	2,02	1,97
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,31	2,23	2,16	2,11	2,07	2,03	1,98	1,93
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,28	2,20	2,12	2,08	2,04	1,99	1,95	1,90
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32	2,25	2,18	2,10	2,05	2,01	1,96	1,92	1,87
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	2,23	2,15	2,07	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27	2,20	2,13	2,05	2,01	1,96	1,91	1,86	1,81
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	2,18	2,11	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,79
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28	2,24	2,16	2,09	2,01	1,96	1,92	1,87	1,82	1,77
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	2,15	2,07	1,99	1,95	1,90	1,85	1,80	1,75
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25	2,20	2,13	2,06	1,97	1,93	1,88	1,84	1,79	1,73
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	2,12	2,04	1,96	1,91	1,87	1,82	1,77	1,71
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18	2,10	2,03	1,94	1,90	1,85	1,81	1,75	1,70
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,09	2,01	1,93	1,89	1,84	1,79	1,74	1,68
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	2,00	1,92	1,84	1,79	1,74	1,69	1,64	1,58
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	1,92	1,84	1,75	1,70	1,65	1,59	1,53	1,47
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,18	2,09	2,02	1,96	1,91	1,83	1,75	1,66	1,61	1,55	1,50	1,43	1,35

ANEXO III

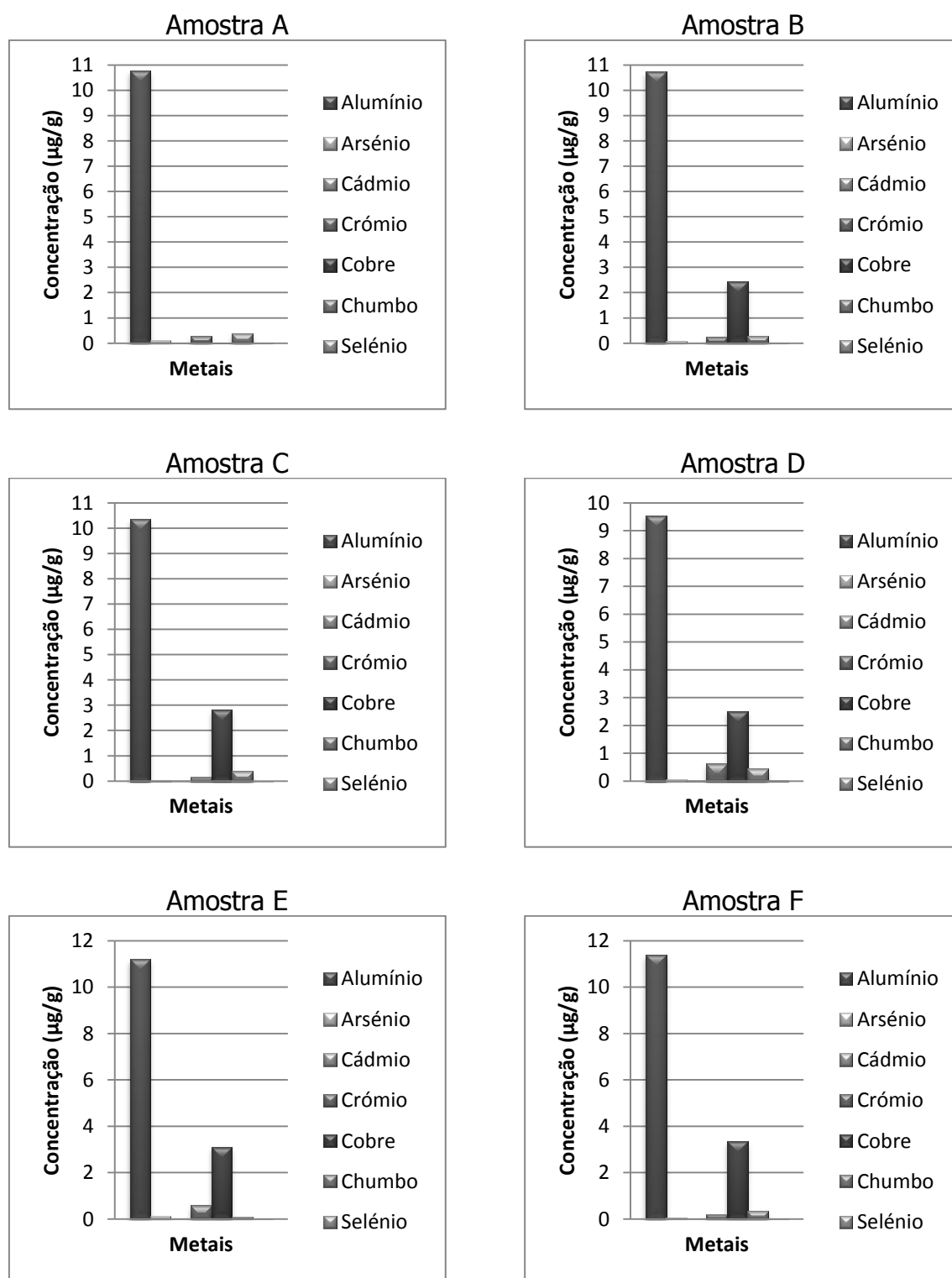
Distribuição de F de Snedcor II

Os valores tabelados correspondem aos pontos x tais que: $P(F_n^m \leq x) = 0.99$

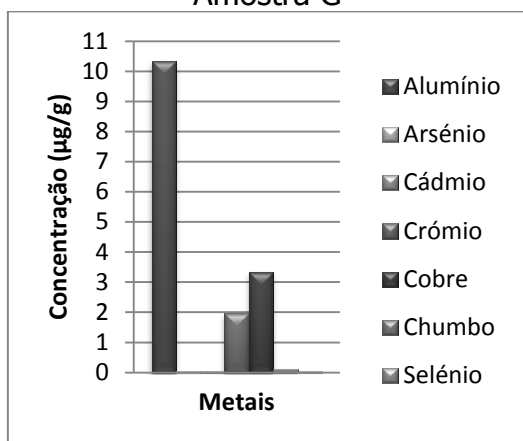
m \ n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120
1	1052	4999.5	5403	5625	5764	5859	5928	5982	6022	6056	6106	6157	6209	6235	6261	6287	6313	6339
2	98,50	99,00	99,16	99,25	99,30	99,33	99,36	99,38	99,39	99,40	99,42	99,43	99,45	99,46	99,47	99,48	99,48	99,49
3	34,12	30,82	29,46	28,71	28,24	27,91	27,67	27,49	27,34	27,23	27,05	26,87	26,69	26,60	26,50	26,41	26,32	26,22
4	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,98	14,80	14,66	14,55	14,37	14,20	14,02	13,93	13,84	13,75	13,65	13,56
5	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,46	10,29	10,16	10,05	9,89	9,72	9,55	9,47	9,38	9,29	9,20	9,11
6	13,75	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,26	8,10	7,98	7,87	7,72	7,56	7,40	7,31	7,23	7,14	7,06	6,97
7	12,25	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	6,99	6,84	6,72	6,62	6,47	6,31	6,16	6,07	5,99	5,91	5,82	5,74
8	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,18	6,03	5,91	5,81	5,67	5,52	5,36	5,28	5,20	5,12	5,03	4,95
9	10,56	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,61	5,47	5,35	5,26	5,11	4,96	4,81	4,73	4,65	4,57	4,48	4,40
10	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,20	5,06	4,94	4,85	4,71	4,56	4,41	4,33	4,25	4,17	4,08	4,00
11	9,65	7,21	6,22	5,67	5,32	5,07	4,89	4,74	4,63	4,54	4,40	4,25	4,10	4,02	3,94	3,86	3,78	3,69
12	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,64	4,50	4,39	4,30	4,16	4,01	3,86	3,78	3,70	3,62	3,54	3,45
13	9,07	6,70	5,74	5,21	4,86	4,62	4,44	4,30	4,19	4,10	3,96	3,82	3,66	3,59	3,51	3,43	3,34	3,25
14	8,86	6,51	5,56	5,04	4,69	4,46	4,28	4,14	4,03	3,94	3,80	3,66	3,51	3,43	3,35	3,27	3,18	3,09
15	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,14	4,00	3,89	3,80	3,67	3,52	3,37	3,29	3,21	3,13	3,05	2,96
16	8,53	6,23	5,29	4,77	4,44	4,20	4,03	3,89	3,78	3,69	3,55	3,41	3,26	3,18	3,10	3,02	2,93	2,84
17	8,40	6,11	5,19	4,67	4,34	4,10	3,93	3,79	3,68	3,59	3,46	3,31	3,16	3,08	3,00	2,92	2,83	2,75
18	8,29	6,01	5,09	4,58	4,25	4,01	3,84	3,71	3,60	3,51	3,37	3,23	3,08	3,00	2,92	2,84	2,75	2,66
19	8,18	5,93	5,01	4,50	4,17	3,94	3,77	3,63	3,52	3,43	3,30	3,15	3,00	2,92	2,84	2,76	2,67	2,58
20	8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,70	3,56	3,46	3,37	3,23	3,09	2,94	2,86	2,78	2,69	2,61	2,52
21	8,02	5,78	4,87	4,37	4,04	3,81	3,64	3,51	3,40	3,31	3,17	3,03	2,88	2,80	2,72	2,64	2,55	2,46
22	7,95	5,72	4,82	4,31	3,99	3,76	3,59	3,45	3,35	3,26	3,12	2,98	2,83	2,75	2,67	2,58	2,50	2,40
23	7,88	5,66	4,76	4,26	3,94	3,71	3,54	3,41	3,30	3,21	3,07	2,93	2,78	2,70	2,62	2,54	2,45	2,35
24	7,82	5,61	4,72	4,22	3,90	3,67	3,50	3,36	3,26	3,17	3,03	2,89	2,74	2,66	2,58	2,49	2,40	2,31
25	7,77	5,57	4,68	4,18	3,85	3,63	3,46	3,32	3,22	3,13	2,99	2,85	2,70	2,62	2,54	2,45	2,36	2,27
26	7,72	5,53	4,64	4,14	3,82	3,59	3,42	3,29	3,18	3,09	2,96	2,81	2,66	2,58	2,50	2,42	2,33	2,23
27	7,68	5,49	4,60	4,11	3,78	3,56	3,39	3,26	3,15	3,06	2,93	2,78	2,63	2,55	2,47	2,38	2,29	2,20
28	7,64	5,45	4,57	4,07	3,75	3,53	3,36	3,23	3,12	3,03	2,90	2,75	2,60	2,52	2,44	2,35	2,26	2,17
29	7,60	5,42	4,54	4,04	3,73	3,50	3,33	3,20	3,09	3,00	2,87	2,73	2,57	2,49	2,41	2,33	2,23	2,14
30	7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,30	3,17	3,07	2,98	2,84	2,70	2,55	2,47	2,39	2,30	2,21	2,11
40	7,31	5,18	4,31	3,83	3,51	3,29	3,12	2,99	2,89	2,80	2,66	2,52	2,37	2,29	2,20	2,11	2,02	1,92
60	7,08	4,98	4,13	3,65	3,34	3,12	2,95	2,82	2,72	2,63	2,50	2,35	2,20	2,12	2,03	1,94	1,84	1,73
120	6,85	4,79	3,95	3,48	3,17	2,96	2,79	2,66	2,56	2,47	2,34	2,19	2,03	1,95	1,86	1,76	1,66	1,53

ANEXO IV

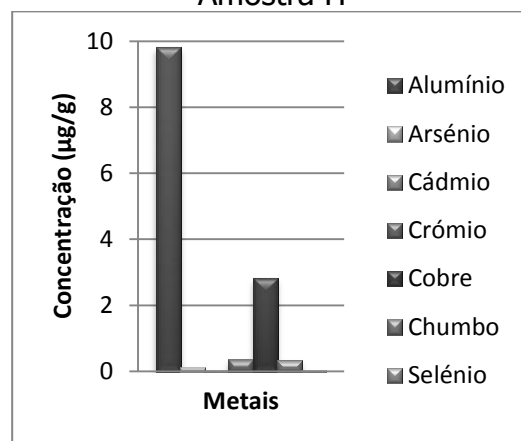
Gráficos Representativos da Análise Quantitativa de Metais em Cada Amostra de Chá.



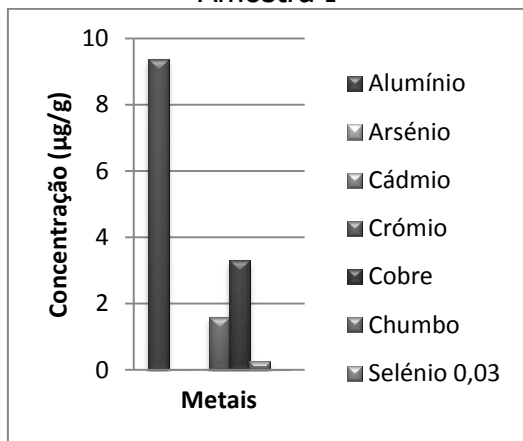
Amostra G



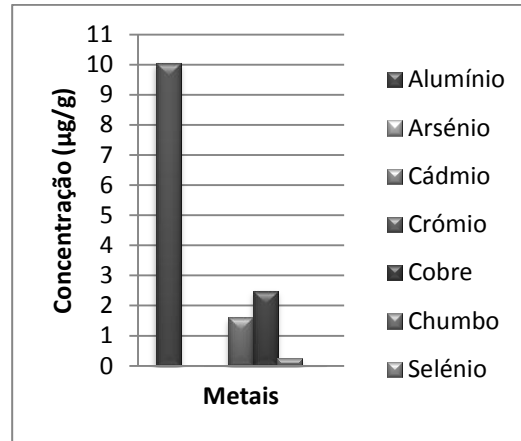
Amostra H



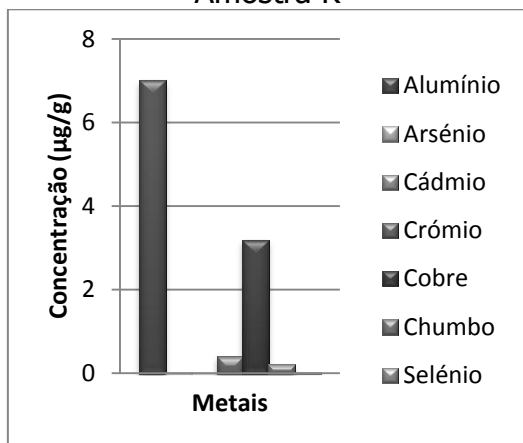
Amostra I



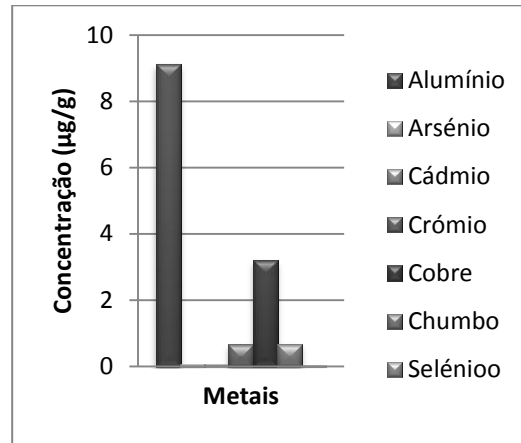
Amostra J



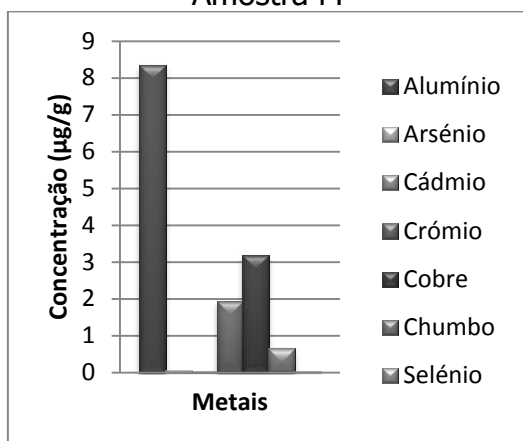
Amostra K



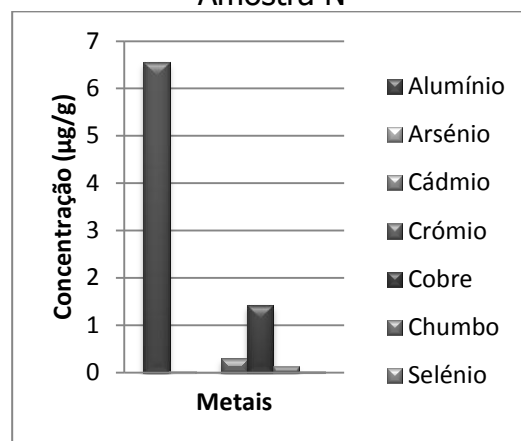
Amostra L



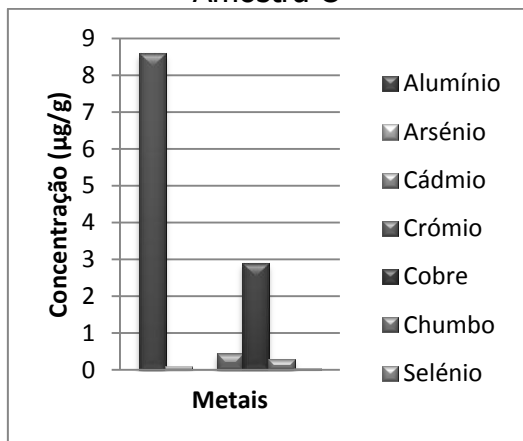
Amostra M



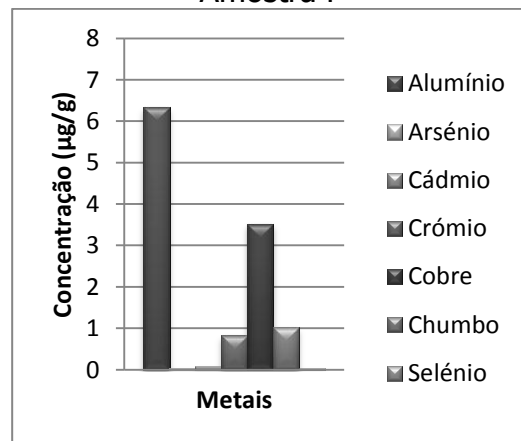
Amostra N



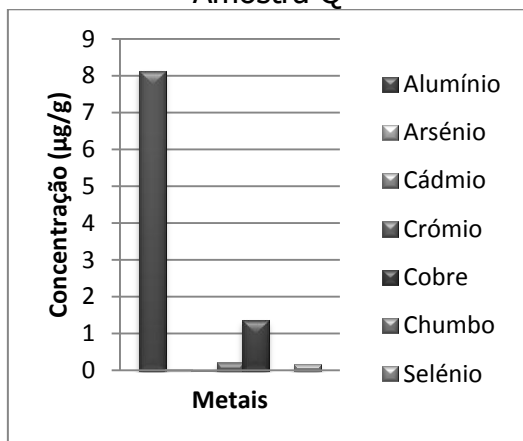
Amostra O



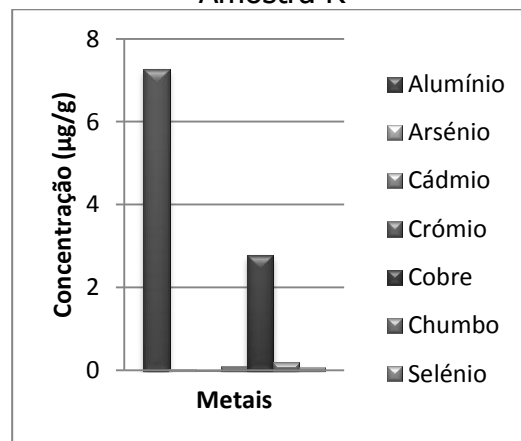
Amostra P



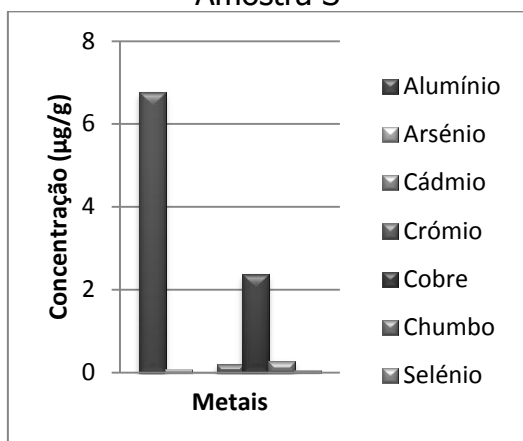
Amostra Q



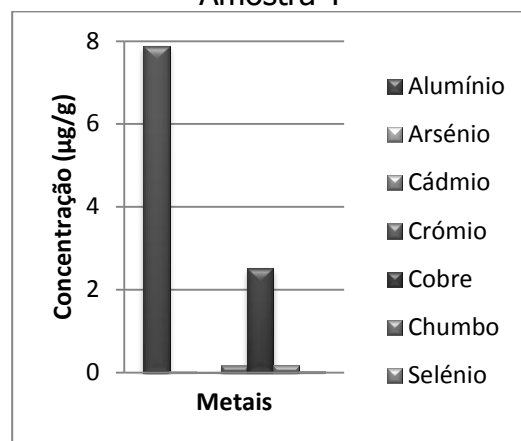
Amostra R



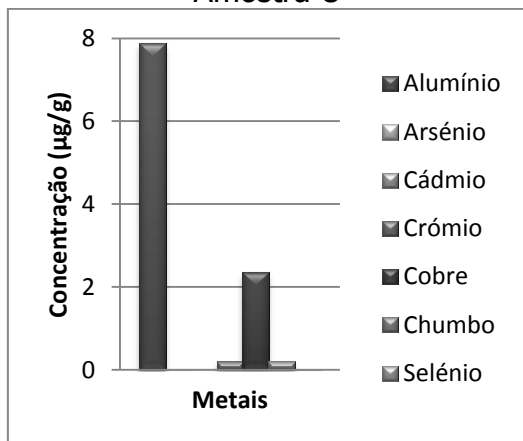
Amostra S



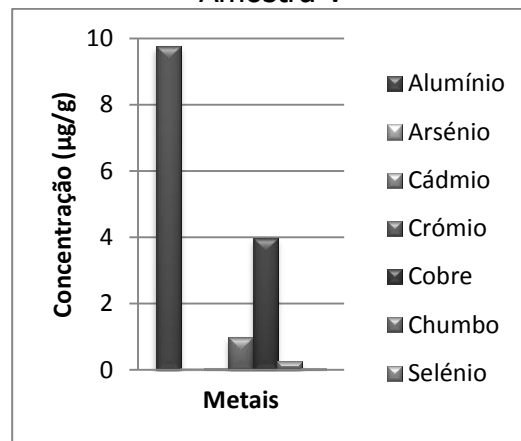
Amostra T



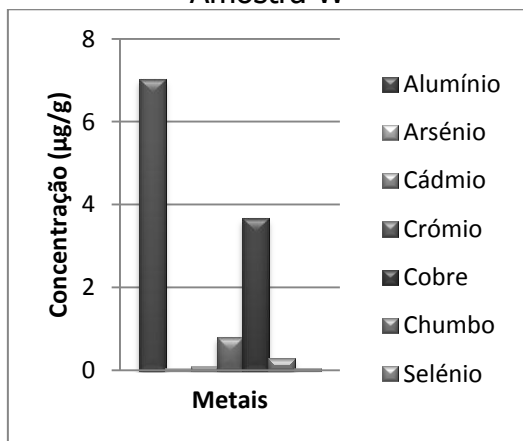
Amostra U



Amostra V



Amostra W



ANEXO V

Tabelas de Resultados do Teste ANOVA

Resultados do teste ANOVA aplicado nos grupos de chá verde e chá preto.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
alumínio	Between Groups	2,235	1	2,235	1,321	,280
	Within Groups	15,230	9	1,692		
	Total	17,465	10			
arsénio	Between Groups	,004	1	,004	5,106	,050
	Within Groups	,008	9	,001		
	Total	,012	10			
cádmio	Between Groups	,000	1	,000	,154	,703
	Within Groups	,001	9	,000		
	Total	,001	10			
crômio	Between Groups	,867	1	,867	1,952	,196
	Within Groups	3,995	9	,444		
	Total	4,861	10			
cobre	Between Groups	,460	1	,460	3,819	,082
	Within Groups	1,084	9	,120		
	Total	1,544	10			
chumbo	Between Groups	,000	1	,000	,003	,956
	Within Groups	,368	9	,041		
	Total	,368	10			
selénio	Between Groups	,000	1	,000	,000	1,000
	Within Groups	,000	9	,000		
	Total	,000	10			

Resultados do teste ANOVA aplicado nos grupos de chá verde e chá branco.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
alumínio	Between Groups	6,821	1	6,821	5,170	,057
	Within Groups	9,236	7	1,319		
	Total	16,057	8			
arsénio	Between Groups	,000	1	,000	,014	,908
	Within Groups	,010	7	,001		
	Total	,010	8			
cádmio	Between Groups	,000	1	,000	,101	,759
	Within Groups	,001	7	,000		
	Total	,001	8			
crómio	Between Groups	,005	1	,005	,159	,702
	Within Groups	,203	7	,029		
	Total	,208	8			
cobre	Between Groups	,154	1	,154	,488	,508
	Within Groups	2,215	7	,316		
	Total	2,370	8			
chumbo	Between Groups	,003	1	,003	,081	,784
	Within Groups	,241	7	,034		
	Total	,243	8			
selénio	Between Groups	,000	1	,000	,000	1,000
	Within Groups	,000	7	,000		
	Total	,000	8			

Resultados do teste ANOVA aplicado nos grupos de chá preto e chá branco.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
alumínio	Between Groups	1,720	1	1,720	,721	,420
	Within Groups	19,081	8	2,385		
	Total	20,802	9			
arsénio	Between Groups	,003	1	,003	4,314	,071
	Within Groups	,006	8	,001		
	Total	,009	9			
cádmio	Between Groups	,000	1	,000	,000	1,000
	Within Groups	,001	8	,000		
	Total	,001	9			
crómio	Between Groups	,891	1	,891	1,820	,214
	Within Groups	3,915	8	,489		
	Total	4,806	9			
cobre	Between Groups	1,091	1	1,091	5,106	,054
	Within Groups	1,709	8	,214		
	Total	2,800	9			
chumbo	Between Groups	,004	1	,004	,149	,710
	Within Groups	,233	8	,029		
	Total	,238	9			
selénio	Between Groups	,000	1	,000	,000	1,000
	Within Groups	,000	8	,000		
	Total	,000	9			

Resultados do teste ANOVA aplicado nos grupos de amostras de infusões e de amostras de chá.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
alumínio	Between Groups	23,754	1	23,754	16,857	,001
	Within Groups	25,364	18	1,409		
	Total	49,119	19			
arsénio	Between Groups	,001	1	,001	1,942	,180
	Within Groups	,014	18	,001		
	Total	,015	19			
cádmio	Between Groups	,000	1	,000	,681	,420
	Within Groups	,012	18	,001		
	Total	,012	19			
crómio	Between Groups	,539	1	,539	1,665	,213
	Within Groups	5,824	18	,324		
	Total	6,363	19			
cobre	Between Groups	,024	1	,024	,063	,805
	Within Groups	6,829	18	,379		
	Total	6,853	19			
chumbo	Between Groups	,011	1	,011	,197	,662
	Within Groups	1,024	18	,057		
	Total	1,035	19			
selénio	Between Groups	,004	1	,004	4,985	,039
	Within Groups	,016	18	,001		
	Total	,020	19			

